



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

*Tesina de grado de la Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de  
la facultad de Ciencias Exactas*

***“Uso de humo líquido como componente activo en películas biodegradables  
a base de pared celular de levadura”***



*Jonathan Axel Cuatto*

*Directora: Dra. Mercedes Ana Peltzer*

*Co-Directora: Dra. Lorena Deladino*

## **Agradecimientos**

A DIOS, por haberme enviado un angel del cielo en Mitre y cinco en el momento más difícil de mi vida.

A mi angelita, por ser la cosita que más amo en este mundo y por demostrarme su amor día a día.

A mi familia, por haberme acompañado a lo largo de todo este camino, ya que sin ellos no hubiera podido realizarlo.

A la Dra. Mercedes Ana Peltzer, por transmitirme sus conocimientos siempre con una sonrisa y mucha alegría, su confianza y por abrirme las puertas del laboratorio 107 de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ).

A la Dra. Lorena Deladino, por su ayuda incondicional, su predisposición y por abrirme las puertas del CIDCA.

A TODOS mis compañeros de la facultad, por tantos hermosos recuerdos, risas y mateadas durante las cursadas.



# Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Hipótesis del trabajo.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Desarrollo del Trabajo.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Humo líquido (HL).....</b>	<b>14</b>
4.1.1. Historia.....	14
4.1.2. Composición.....	15
4.1.3. Factores que afectan la composición del HL.....	17
4.1.3.1. Tipo de madera.....	17
4.1.3.2. Temperatura.....	18
4.1.3.3. Aire.....	19
4.1.3.4. Contenido de humedad de la madera.....	20
4.1.3.5. Tamaño de la madera.....	21
4.1.3.6. Almacenamiento.....	21
4.1.3.7. Métodos de generación de humo.....	21
4.1.4. Métodos de obtención.....	21
4.1.5. Tipos de HL: Entero o refinado.....	25
4.1.6. Legislación.....	26
4.1.7. Usos del HL en alimentos.....	27
4.1.8. Relevamiento de productos alimenticios con HL en el mercado argentino y mundial.....	28
4.1.9. Propiedades del HL.....	29
4.1.9.1. El HL como antioxidante natural.....	29
4.1.9.2. El HL como antimicrobiano natural.....	30
4.1.9.3. Mecanismos de acción sobre agentes oxidantes.....	31
4.1.9.4. Mecanismos de acción sobre microorganismos.....	33
4.1.9.5. Usos potenciales del HL en alimentos.....	34
4.1.9.6. Comparación con agentes antioxidantes de origen natural.....	35
4.1.9.7. Comparación con antimicrobianos de origen natural.....	36
<b>4.2. Películas biodegradables a base de pared celular de levadura.....</b>	<b>38</b>
4.2.1. Películas biodegradables.....	38
4.2.1.1. Descripción.....	38
4.2.1.2. Fuentes.....	38
4.2.1.2.1. Animal.....	39
4.2.1.2.2. Vegetal.....	39

4.2.1.2.3. Algas.....	40
4.2.1.2.4. Microorganismos.....	41
4.2.1.3. Legislación.....	42
4.2.2. Pared celular de levadura.....	43
4.2.2.1. Composición.....	43
4.2.2.2. Métodos de obtención.....	45
4.2.2.2.1. Métodos mecánicos de ruptura celular.....	46
4.2.2.2.2. Métodos no mecánicos de ruptura celular.....	49
4.2.3. Uso de pared celular de levadura como base de películas biodegradables.....	50
4.2.3.1. Características de las películas de pared celular.....	51
4.2.3.2. Antecedentes de aplicaciones en alimentos.....	52
<b>4.3. Incorporación de HL como compuesto activo en películas biodegradables.....</b>	<b>54</b>
4.3.1. Envases activos.....	54
4.3.1.1. Tipos de envases activos.....	55
4.3.1.1.1. Absorbedores/Eliminadores.....	55
4.3.1.1.2. Emisores/Liberadores.....	57
4.3.1.1.3. Otros sistemas.....	58
4.3.1.2. Legislación.....	58
4.3.2. Liberación de los compuestos activos en alimentos o simulantes alimentarios.....	61
4.3.2.1. Ensayos de migración de los compuestos activos en simulantes alimentarios.....	61
4.3.2.2. Métodos de detección y cuantificación.....	63
4.3.2.3. Descripción de mecanismos de liberación del compuesto activo.....	63
4.3.3. Caracterización de las películas activas.....	67
4.3.3.1. Determinación del espesor.....	67
4.3.3.2. Determinación de la transparencia.....	68
4.3.3.3. Determinación del color mediante coordenadas CIELAB.....	68
4.3.3.4. Determinación de la estructura.....	69
4.3.3.5. Determinación de la solubilidad en agua.....	70
4.3.3.6. Permeabilidad al vapor de agua ( $P_w^{exp}$ ).....	70
4.3.3.7. Determinación de la permeabilidad al $CO_2$ .....	72
4.3.3.8. Permeabilidad al oxígeno: Tasa de Transferencia de Oxígeno (OTR).....	73
4.3.3.9. Análisis Termogravimétrico (TGA).....	73
4.3.3.10. Determinación de las propiedades mecánicas.....	75
4.3.4. Evaluación de la funcionalidad de las películas activas.....	76
4.3.4.1. Evaluación de la capacidad antioxidante de las películas activas.....	76
4.3.4.2. Evaluación de la efectividad antimicrobiana de las películas activas.....	78
4.3.5. Incorporación de HL en envases activos.....	79
4.3.5.1. Antecedentes.....	79
4.3.5.2. Potencialidad de uso en alimentos.....	80

4.3.5.3. Incorporación de HL refinado en películas a base de pared celular de levadura....	81
4.3.5.3.1. Materia prima utilizada en la elaboración de las películas de pared celular de levaduras activas (PPCL-HL).....	81
4.3.5.3.2. Análisis estadístico.....	81
4.3.5.3.3. Caracterización del HL.....	81
4.3.5.3.4. Obtención de la pared celular de levadura.....	84
4.3.5.3.5. Elaboración de las PPCL-HL.....	84
4.3.5.3.6. Caracterización de las PPCL activas.....	85
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>91</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>92</b>

## Tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición del HL comercial.....	17
<b>Tabla 2.</b> Composición química de distintos tipos de madera.....	17
<b>Tabla 3.</b> Composición del humo de distintas maderas.....	18
<b>Tabla 4.</b> Influencia de la temperatura en la destrucción térmica de la madera.....	18
<b>Tabla 5.</b> Influencia de la temperatura de “smouldering” en los contenidos de fenoles, carbonilos y ácidos en humos de madera.....	19
<b>Tabla 6.</b> Influencia de la temperatura de generación del humo en el contenido de fenoles en el producto final.....	19
<b>Tabla 7.</b> Contenido de compuestos volátiles en función del porcentaje de oxígeno en el aire.....	20
<b>Tabla 8.</b> Influencia de la humedad de la madera en la composición química y las propiedades sensoriales.....	20
<b>Tabla 9.</b> Contenido de benzopireno de tres HLs diferentes.....	25
<b>Tabla 10.</b> Comparación en el contenido de compuestos orgánicos en HLs comerciales.....	25
<b>Tabla 11.</b> Comparación en el contenido de ácido acético y pH en HLs comerciales.....	26
<b>Tabla 12.</b> Empresas que elaboran alimentos ahumados a nivel mundial.....	29
<b>Tabla 13.</b> Mecanismo de acción de antioxidantes.....	32
<b>Tabla 14.</b> Capacidad antioxidante de orégano, romero y dos HLs comerciales determinada por ensayo DPPH.....	36
<b>Tabla 15.</b> Comparación de la capacidad antimicrobiana de tres antimicrobianos naturales distintos frente a <i>S. aureus</i> .....	37
<b>Tabla 16.</b> Usos y propiedades de la célula de levadura <i>S. cerevisiae</i> y sus componentes.....	51
<b>Tabla 17.</b> Diluciones para la curva de calibración de la Vit. C.....	82
<b>Tabla 18.</b> Diluciones para la curva de calibración del HL.....	83
<b>Tabla 19.</b> Masa (g) de HL y glicerol y medida del pH de la dispersión final para cada formulación.....	84
<b>Tabla 20.</b> Espesor de las películas de las distintas formulaciones.....	86
<b>Tabla 21.</b> Parámetros L*, a* y b* y $\Delta E$ expresados en coordenadas del espacio colorimétrico CIELAB.....	87
<b>Tabla 22.</b> Propiedades mecánicas de las películas formuladas con distintas concentraciones de HL.....	89

## Figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo de producción de HL.....	22
<b>Figura 2.</b> Comparación del color del HL de diferentes grados de filtración.....	26
<b>Figura 3.</b> Mercado del HL en Estados Unidos (millones de USD).....	28
<b>Figura 4.</b> Mercado global del HL por región 2018 (%).....	28
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de los ácidos presentes en el HL.....	34
<b>Figura 6.</b> Composición de la pared celular de levaduras.....	43
<b>Figura 7.</b> Unidades poliméricas de $\beta$ -(1-3)-D-glucopiranosil con ramificaciones en $\beta$ -(1-6).....	44
<b>Figura 8.</b> Estructura de la quitina.....	45
<b>Figura 9.</b> Métodos de ruptura celular.....	46
<b>Figura 10.</b> Partes y funcionamiento de un molino de perlas horizontal.....	47
<b>Figura 11.</b> Homogeneizador HPH Panda.....	48
<b>Figura 12.</b> Diagrama del funcionamiento de un sonicador.....	48
<b>Figura 13.</b> Tipos de envases activos según su función.....	55
<b>Figura 14.</b> Símbolo que representa las partes no comestibles.....	60
<b>Figura 15.</b> Perfiles de concentración del migrante en películas plásticas de espesor h y en contacto con simulante alimentario luego de distintos tiempos de incubación.....	64
<b>Figura 16.</b> Micrómetro Digital 0-25 Mm Insize 3109-25a.....	68
<b>Figura 17.</b> Parámetros del CIELAB.....	69
<b>Figura 18.</b> Equipo FTIR Pike GladiATR.....	70
<b>Figura 19.</b> Esquema de la celda utilizada para determinar la $P_w^{exp}$ en películas.....	71
<b>Figura 20.</b> Celda utilizada en los ensayos de permeabilidad al $CO_2$ .....	72
<b>Figura 21.</b> C201B Oxygen Transmission Rate Test System. Labthink.....	73
<b>Figura 22.</b> Equipo de análisis termogravimétrico.....	74
<b>Figura 23.</b> Gráficas obtenidas en el TGA.....	74
<b>Figura 24.</b> Recta tangente en la zona elástica lineal.....	75
<b>Figura 25.</b> Grado de inhibición en función del diámetro del halo exhibido.....	79
<b>Figura 26.</b> Curva de calibración de la Vit. C.....	82
<b>Figura 27.</b> Curva de calibración del HL.....	83
<b>Figura 28.</b> Películas obtenidas a base de pared celular de levadura.....	85
<b>Figura 29.</b> Zonas en las que se midió el espesor de las películas.....	85
<b>Figura 30.</b> Zonas de la película en las que se evaluó el color.....	87
<b>Figura 31.</b> Comparación del color y aspecto visual de las películas de diferentes formulaciones....	88
<b>Figura 32.</b> Probetas utilizadas en la evaluación de las propiedades mecánicas.....	88
<b>Figura 33.</b> Discos de películas utilizados para el ensayo de ABTS.....	89
<b>Figura 34.</b> Actividad antiradicalaria en función del tiempo.....	90





## 1. Introducción

El desarrollo de películas activas a base de biopolímeros es de gran interés tanto para la industria como para la comunidad científica. El uso de sistemas activos antimicrobianos y antioxidantes aporta muchas ventajas a la hora de preservar alimentos, ya que se evita el agregado de aditivos en la formulación de los mismos y se asegura una concentración constante de compuesto activo en la superficie del alimento, con la liberación gradual del mismo. Debido a las exigencias de los consumidores respecto de la oferta de productos de calidad, el uso de aditivos de origen natural también se encuentra en el foco de las investigaciones.

Desde hace ya algunos años, existe una creciente tendencia por parte de la comunidad científica, industrial y de los consumidores en reducir la contaminación medioambiental producida por materiales derivados del petróleo luego de su uso (Song y col., 2009). En ese sentido, los estudios en la aplicación de biopolímeros para el desarrollo de envases biodegradables han aumentado considerablemente, ubicándolos como una potencial alternativa de los polímeros petroquímicos (Othman, 2014). Los biopolímeros utilizados para el desarrollo de materiales biodegradables son principalmente polisacáridos, proteínas y mezclas de éstos, ya que han demostrado buenas propiedades para la formación de matrices destinadas al contacto con alimentos (Al-Hassan y Norziah, 2012; Huber y Embuscado, 2009). En cuanto al uso de proteínas, tanto de origen vegetal y animal, como la de soja, caseinato y gelatina poseen buenas propiedades filmogénicas (Ciannamea y col., 2014; Arrieta y col., 2013; Martucci y col., 2015). Entre los polisacáridos más utilizados se encuentra el almidón, representando uno de los principales biopolímeros destinado al desarrollo de materiales en contacto con alimentos, también se describen trabajos en los cuales se utilizan hidrocoloides tales como los alginatos, carragenatos y el quitosano (Rinaudo, 2014; Shojaee-Aliabadi y col., 2014; Quesada y col., 2016). Estudios previos demostraron la posibilidad del uso de biomasa completa de levadura para formar películas biodegradables, gracias a su composición en proteínas y polisacáridos ( $\beta$ -glucano) (Delgado y col., 2018 a). Entre las propiedades beneficiosas de los  $\beta$ -glucanos, se destaca su capacidad de formar películas con características muy prometedoras (Peltzer y col., 2018 a; Novák y col., 2012). La pared celular de levadura, compuesta principalmente por  $\beta$ -glucanos y manoproteínas, también ha demostrado una buena capacidad filmogénica (Peltzer y col., 2018) y posee la ventaja de ser un sistema multicomponente en el cual se presentan las ventajas de cada biopolímero (Razzaq y col., 2016). Además, la pared celular puede utilizarse como materia prima para el desarrollo de microencapsulados de colorantes, sabores o antioxidantes (Dardelle y col., 2007).

Se ha demostrado en varios estudios que los biopolímeros son buenos vehículos de antioxidantes y antimicrobianos, dando la posibilidad de obtener los ya mencionados sistemas activos (Peltzer y col., 2017). Las hierbas y especias poseen aceites esenciales que en su composición presentan compuestos con características antimicrobianas y antioxidantes, como el carvacrol (orégano), el timol (orégano, tomillo), cinamaldehído (canela), entre otros, por lo que resultan de gran interés para ser añadidos en matrices poliméricas, en particular, en matrices biodegradables. Arrieta y col. desarrollaron películas activas de caseinato de sodio y de calcio con la adición de carvacrol como antimicrobiano (Arrieta y col., 2014). En estos estudios se obtuvieron

resultados prometedores en cuanto a las propiedades de las películas como un material para uso alimentario como así también, se estudió la liberación del antimicrobiano observándose resultados positivos de inhibición. Mientras que Martucci y col. desarrollaron películas de gelatina con el agregado de aceite esencial de orégano y lavanda (Martucci y col., 2015). Asimismo, películas a base de pared celular de levadura con el agregado de antioxidantes naturales como las Nafto-y-pironas, fueron desarrolladas con éxito y presentaron buenas propiedades antioxidantes (Rezzani, 2018; Choque y col., 2021).

En el presente trabajo, se propone el uso de humo líquido (HL) como agente activo antimicrobiano y antioxidante, en películas biodegradables a base de pared celular de levadura. Las ventajas y beneficios asociados con el uso de HL en alimentos incluyen la facilidad de su aplicación para optimizar el potencial antioxidante, las propiedades sensoriales y las propiedades antimicrobianas (Wang y col., 2016 b). Las preparaciones de HL se pueden controlar y evaluar fácilmente para determinar la composición y su posible aplicación. Por lo general, el HL se produce al quemar astillas de madera o aserrín en condiciones bajas de oxígeno, lo que resulta en la formación de un condensado, que se recoge y purifica. El HL contiene algunos compuestos aromatizantes, como aldehídos, y es un líquido de color marrón claro. Se utiliza para dar sabor ahumado a las recetas de carne, pescado y en recetas para vegetarianos (simil carne). En la industria de procesamiento de alimentos, el HL se ha utilizado ampliamente para reemplazar el método tradicional de ahumado, ya que presenta mayores ventajas respecto a un mejor control del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), una mayor diversidad de aplicaciones en los sistemas alimentarios, una homogeneidad superior del producto, facilidad de almacenamiento, y menos contaminación ambiental (Montazeri y col., 2013 a). Además de su sabor a humo que es único, se ha demostrado que el HL presenta actividad antimicrobiana (Lingbeck y col., 2014; Saloko y col., 2014) y antioxidante (Guillén y Cabo, 2004; Martinez y col., 2007). Este tipo de humo líquido es el llamado “sabor intenso”, y posee ciertas desventajas como su alto sabor a humo y compuestos con color, lo que limita su aplicación en algunos alimentos como compuesto antimicrobiano (Vitt y col., 2001). Por otro lado, el HL puede ser refinado, para poder ser aplicado en diversos productos. El aroma deseado se puede ajustar adicionando compuestos fenólicos, carbonilos y ácidos orgánicos. Se ha demostrado que este HL comercial refinado es altamente efectivo frente a varios tipos de microorganismos contaminantes y patógenos, utilizando concentraciones más bajas del producto (Milly y col., 2005; Montazeri y col., 2013 a). Por lo tanto, la incorporación de HL es un enfoque prometedor para el desarrollo de películas activas.

## **2. Objetivos**

El objetivo del presente trabajo es estudiar en el plano teórico la posibilidad de emplear HL entero y refinado como agente antimicrobiano y antioxidante en películas biodegradables a base de biomasa de levadura con aplicaciones alimenticias, comprendiendo:

2.1 El estudio de los tipos de HL existentes en la industria, métodos de obtención y efectividad como antimicrobiano y antioxidante, comparación de su actividad con otros compuestos de origen natural, como los aceites esenciales (tomillo, orégano, romero);

2.2 El estado del arte del uso de HL como agente activo en materiales biodegradables para aumentar la vida útil de alimentos;

2.3 La incorporación en películas biodegradables a base de levadura. Metodología. Métodos de caracterización.

### **3. Hipótesis del trabajo**

Es posible la incorporación de HL en películas de pared celular de levadura para el desarrollo de envases activos con capacidad antimicrobiana y antioxidante para extender la vida útil de alimentos.

## **4. Desarrollo del trabajo**

### **4.1. Humo líquido (HL)**

#### **4.1.1. Historia**

El descubrimiento del fuego es uno de los acontecimientos más importantes en la historia y en la evolución del ser humano. La evidencia convincente más temprana data hace 500.000 años a.C en Europa y 790.000 años a.C en el cercano oriente (Daniau y col., 2010). Fogatas en Qesem Cave, Israel y artefactos de cuero curtido encontrados recientemente confirman la idea que el hombre primitivo tenía en su poder el control del fuego (Daniau y col., 2010; Milly, 2003). La perplejidad y el asombro que emanaba en llamas, fue tal vez la chispa que encendió la curiosidad del hombre, que poco a poco a lo largo del tiempo fue aprendiendo a través de experiencias y errores a dominarlo y finalmente utilizarlo de diversas formas como; protección frente a diversos depredadores, observación en la oscuridad, obtención de herramientas para la caza de animales, fuente de calor para atravesar los fríos y crudos inviernos y, por supuesto, para su alimentación (Franca y Luiz, 2019).

El camino recorrido hasta llegar a dominar este arte no fue nada fácil ni menos predictivo. De hecho, muchas de las técnicas, métodos y procesos que conocemos hoy en día en nuestra cocina y a nivel industrial surgieron por simples accidentes que cambiaron el rumbo de la historia. Tal es así, que el hombre primitivo, en un intento por secar las presas atrapadas del día, al ser colgadas, se percató que el humo de las fogatas le transfería a la carne un aroma y un sabor característico, el cual conocemos hoy en día con el nombre de “ahumado” (Simon y col., 2005; Agustinelli, 2014).

El ahumado junto con el salado y el secado es una de las tecnologías más antiguas para extender la naturaleza perecedera de los alimentos y conferirle propiedades sensoriales deseables (aroma, sabor, textura, etc.) que datan de la Edad Media (siglo V-XV). La carne y los pescados (principalmente) eran sometidos a un salado en exceso y posterior ahumado con el fin de alargar la vida útil de los mismos y evitar perder las grandes cantidades de alimentos (Holzschuh y col., 2010; Agustinelli, 2014). Estos “ahumaderos” consistían de pequeños trozos de madera que se quemaban en su interior donde el humo resultante se canalizaba de tal manera que tuviera contacto directo superficial con el alimento en cuestión (Milly, 2003). La técnica se fue mejorando y perfeccionando gradualmente a lo largo del tiempo al modificar las variables del proceso como temperatura, ubicación de las piezas respecto al humo, tiempo de exposición al mismo, materia prima, etc., lo cual llevó a grandes mejoras con respecto a la metodología primitiva (Agustinelli, 2014).

Los conocimientos previos y los avances en la tecnología del ahumado de la Edad Media permitieron que Johann Rudolf Glauber, en 1658, describiera los métodos para producir condensados de humo de leña o más conocido como “vinagre de madera”. Dichos condensados se producen durante la fabricación de carbón vegetal, el cual en 1788, recibiría el nombre de ácido piroleñoso (Armstrong y Deischer, 1942; Tiilikkala y col., 2010; White y Woodward, 2007; Burns,

2014). Este nombre que parece extraño, de hecho no lo es, y como pocos podrán imaginar su nombre terminó convirtiéndose en lo que hoy día conocemos como “Humo Líquido” (HL).

El HL es un condensado que se obtiene a partir de la pirólisis de la madera y lleva su nombre debido a su inventor, E. H. Wright, que en 1895 comenzó a producir y distribuir comercialmente el producto alrededor de los Estados Unidos bajo dicho nombre (Dien y col., 2019; Melville, 1923). El uso y consumo a lo largo de las décadas del nuevo siglo por gran parte de la población estadounidense impulsó a que en 1959 comenzara una nueva era de productos a base de humo condensado llevada a cabo por el establecimiento Red Arrow Products Company en Manitowoc, Wisconsin. Esta nueva era marcó un quiebre en la historia debido a que la producción de condensados modernos comenzó a ser utilizada industrialmente como reemplazo del ahumado tradicional (Harris, 2015).

Hoy en día, el HL es ampliamente utilizado por la población en todas partes del mundo principalmente por el aroma y sabor ahumado que le confiere a los alimentos, permitiendo abrir una nueva gama de sensaciones en el paladar del consumidor (Conde, 2018; Grand View Research, 2019). Por otro lado, los avances tecnológicos y el desarrollo de nuevas herramientas permite que los investigadores concentren sus estudios no sólo en mejorar el rendimiento de las distintas etapas de su elaboración, minimizar costos y desarrollar nuevas técnicas de producción, sino también buscar nuevos recursos naturales para la fabricación de HL, cuantificación y análisis de los distintos componentes que se producen, de modo de asegurar su aplicación en alimentos (Agustinelli, 2014).

Indistintamente de cuál sea el motivo de su uso, no debemos olvidar que cada vez que escuchemos nombrar “humo líquido”, la misma resonará de modo vehemente en las cavernas de nuestros antepasados en las cuales alguna vez el humo y el fuego danzaron juntos.

#### **4.1.2. Composición**

Físicamente, el humo está compuesto por una mezcla de fases gaseosas, líquidas y sólidas (Simon y col., 2005). El humo utilizado en alimentos proviene de las múltiples reacciones de oxidación y recombinación que ocurren en la combustión de la madera (celulosa, lignina y hemicelulosa), que generan más de 200 componentes diferentes los cuales se clasifican en cuatro grandes grupos: ácidos, fenoles, carbonilos e hidrocarburos (Sanchez Irigoien, 2017).

##### **Ácidos orgánicos y derivados**

Los ácidos orgánicos y sus derivados provienen de la pirólisis parcial de la celulosa y la hemicelulosa, entre los cuales se encuentran los ácidos propiónico, benzoico, fórmico, butírico, crotonico, isovanílico, oleico, acético, entre otros, siendo éste último el mayor constituyente y referente de los mismos (Montazeri y col., 2013 a; Swastawati y col., 2007; Guillén y Manzanos, 1999; Oramahi y Diba, 2013). Los ácidos orgánicos y sus derivados están presentes en un 2,8-9,5% en el producto final y son responsables de muchas de las características intrínsecas del HL tales como acidez, color, capacidad antimicrobiana, sabor. Asimismo, presentan un papel importante en

la formación de la corteza de los productos cárnicos al interactuar con las proteínas (coagulación) (Milly, 2003; Montazeri y col., 2013 a; Xin y col., 2020; Underwood y Graham, 1989; Revista lalimentos, 2015).

### Fenoles

Los derivados fenólicos provienen de la degradación térmica de la lignina. Los componentes comúnmente presentes son guayaacol (2-metoxifenol), pirocatecol (1,2-dihidroxibenceno), eugenol (4-alil-2-metoxifenol), siringol (1,3-dimetoxi-2-hidroxibenceno), entre otros, siendo éste último el componente mayoritario (Guillén y col., 1999; Underwood y Graham, 1989; Montazeri y col., 2013 a). Los fenoles constituyen el 0,2-2,9% del producto final y son los principales responsables del aporte del aroma y sabor “ahumado” tan característico y distinguido (principalmente el eugenol y siringol). También contribuyen en el color y poseen actividad antimicrobiana y antioxidante respaldada por muchos estudios (Milly, 2003; Underwood y Graham, 1989; Montazeri y col., 2013 a; Guillén y Manzanos, 1999).

### Carbonilos

La degradación térmica de la celulosa y la hemicelulosa generan derivados carbonílicos tales como cetonas, aldehídos, furanos, piranos entre otros, que están presentes en un 2,6-4,6% en el producto final (Guillén y Manzanos, 1999; Milly, 2003). Estos compuestos presentan actividad antimicrobiana y aportan color, aroma y cambios en la textura. Específicamente, los piranos y furanos son los responsables del color “amarronado” característico, al ser uno de los tantos componentes que se forman en la reacción de Maillard. También son responsables del olor del HL siendo capaces de suavizar parcialmente el intenso aroma a “humo” o “ceniza” de los compuestos fenólicos (Guillén y Manzanos, 1999; Xin y col., 2020; Lingbeck y col., 2014; Underwood y Graham, 1989).

### Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos que contienen exclusivamente carbono e hidrógeno en su estructura. Entre los más destacados se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) formados por anillos de 5 o 6 átomos de carbono unidos entre sí, que se forman por la combustión incompleta o la descomposición térmica (pirólisis) de la materia orgánica, como la madera (McMurry, 2008; Agudo, 2009; Gomaa y col., 1993).

El benzopireno, es un indicador de los niveles de HAPs en HL, y dada su capacidad de producir daños perjudiciales en el medio ambiente y en la salud de los seres vivos, se intenta evitar o reducir su contenido en el HL a valores que sean aptos para su consumo, especialmente en alimentos (Gomaa y col., 1993; Autino y col., 2013; Milly, 2003). De acuerdo al Código Alimentario Argentino (C.A.A), capítulo (cap.) XVIII, los aromatizantes/saborizantes (categoría a la que corresponde el HL) “no deben transferir más de 0,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de 3,4-benzopireno al alimento final” mientras que su contenido en el producto final “no debe ser mayor a 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ” (FAO, 2001).



En resumen, en la **Tabla 1** se muestra la composición química del HL y las cantidades relativas presentes de sus constituyentes. Como es de esperar, el contenido de los mismos va a depender de múltiples factores involucrados en el proceso de elaboración tales como: tipo de madera, temperatura, aire, contenido de humedad, tamaño de la madera, tiempo de almacenamiento y métodos de generación de humo.

**Tabla 1.** Composición del HL comercial

Fracción	%
Agua	11 - 92
Fenoles	0,2 – 2,9
Ácidos	2,8 – 9,5
Carbonilos	2,6 – 4,6
Hidrocarburos	1 - 17

(Fuente: Milly, 2003)

#### **4.1.3. Factores que afectan la composición del HL**

##### **4.1.3.1. Tipo de madera**

La madera está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina en distintas proporciones (**Tabla 2**) y puede clasificarse en dos tipos: duras y blandas (Xin y col., 2020).

La celulosa es un polímero lineal de cadena larga compuesta de glucosa (que oscila entre unas 9.000 a 15.000 unidades) unidas por enlace glicosídico  $\beta$  (1-4) (Milly, 2003). La hemicelulosa, consta de más de un tipo de polisacárido y se puede considerar como una mezcla de glucosa, galactosa, manosa, xilosa y ramnosa. Su descomposición produce ácido acético y dióxido de carbono, entre otros (Montazeri y col., 2013 a; Milly, 2003). La lignina es un polímero vegetal formado por unidades de fenilpropanoides y su descomposición térmica parcial produce diversos tipos de compuestos fenólicos (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

**Tabla 2.** Composición química de distintos tipos de madera

Tipo de madera	Región	% en peso de madera seca		
		Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
<b><i>Maderas duras</i></b>				
Madera de cerezo	América del norte	46	29	18
Arce rojo	América del norte	41	24	28
Haya	Europa	45	33	20
<b><i>Maderas blandas</i></b>				
Pino	Europa	47	20	27
Abeto	Europa	45	22	30

(Adaptado de Xin y col., 2020)

Las cantidades de celulosa, hemicelulosa y lignina en la madera son determinantes en el contenido de ácidos, fenoles, carbonilos e hidrocarburos (**Tabla 3**). El haya, el haya blanca y el roble producen humo con un alto contenido de ácidos debido a que son maderas duras, ricas en pentosanos. Por otro lado, las maderas blandas como el pino y el abeto con mayor contenido de hexanos, producen humo con altos contenidos de carbonilos (Maga, 1987; Simon y col., 2005).

Las diferencias arrojadas en el contenido de fenoles puede deberse a que la estructura de la lignina es levemente distinta entre los dos tipos de madera, presentando las maderas blandas menos grupos metoxi (Maga, 1987).

Los ácidos glucurónicos, que están presentes en las maderas duras en un nivel relativamente alto, se descomponen en ácidos carboxílicos resultando en condensados de mayor acidez (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

**Tabla 3.** Composición del humo de distintas maderas

Componente	g/100 g aserrín				
	Abeto	Pino	Roble	Haya	Haya blanca
Monocarbonilos	3,06	3,10	2,40	1,77	2,50
Ácidos totales	3,07	3,17	3,56	4,06	6,79
Fenoles	0,29	0,29	0,16	0,14	0,32
pH	3,8	4,7	4,0	4,8	4,1

(Adaptado de Maga, 1987)

#### 4.1.3.2. Temperatura

Es uno de los parámetros que más influye y afecta en la composición del humo debido a que los procesos individuales de la degradación térmica de la madera se producen a temperaturas específicas (**Tabla 4**) (Simon y col., 2005).

**Tabla 4.** Influencia de la temperatura en la destrucción térmica de la madera

Temperatura (°C)	Reacción
Hasta 170	Pérdida de agua, secado
200-260	Descomposición de la hemicelulosa
260-310	Descomposición de la celulosa
310-500	Descomposición de la lignina
Mayor a 500	Reacciones secundarias incluyendo oxidación, polimerización, condensación y pirólisis

(Fuente: Milly, 2003)

Maga (1987) y Simon y col. (2005) demostraron que en general un aumento en la temperatura provoca un aumento en el contenido de ácidos, fenoles y carbonilos (**Tabla 5**). La temperatura de “smouldering” hace referencia al proceso de combustión incompleta a baja temperatura sin llama (Galán, 2016).

**Tabla 5.** Influencia de la temperatura de “smouldering” en los contenidos de fenoles, carbonilos y ácidos en humos de madera

Temperatura (°C)	Fenoles (g fenol/ml)	Carbonilos (mg acetaldehído/ml)	Ácidos (Meq ácido/ml)
252	88	20,0	0,082
287	91	20,2	0,077
322	153	27,3	0,121
355	197	31,2	0,104
386	165	37,2	0,112

(Fuente: Maga, 1987)

En la **Tabla 6** se puede observar la influencia del incremento de la temperatura de generación del humo en el contenido de fenoles, alcanzándose valores máximos a 650 °C.

Del mismo modo que existe una dependencia en el contenido de dichos componentes con la temperatura, los HAPs aumentan en un intervalo entre 400-1000 °C, mientras que se alcanzan niveles decrecientes a temperaturas más elevadas (Simon y col., 2005).

**Tabla 6.** Influencia de la temperatura de generación del humo en el contenido de fenoles en el producto final

Temperatura de generación (°C)	Contenido (mg/100g)			
	Fenol	Guayacol	Benzocatecol	Siringol
450	20	60	35	85
550	30	85	60	150
650	55	125	135	260
750	20	115	135	215
850	25	100	125	175

(Fuente: Maga, 1987)

#### 4.1.3.3. Aire

La cantidad de aire presente en la generación de humo es otro factor que puede influir en la composición del HL. En la **Tabla 7** se puede observar cómo disminuye el contenido de los furanos a medida que aumenta el porcentaje de oxígeno, lo cual demuestra que éste último no es un requisito previo para la formación de los mismos. Curiosamente, los fenoles (guayacol) y

carbonilos (cicloteno) presentaron su máximo valor al 10% de oxígeno, para luego disminuir a concentraciones más altas de éste último (Maga, 1987).

**Tabla 7.** Contenido de compuestos volátiles en función del porcentaje de oxígeno en el aire

% Oxígeno en el aire	% Área de pico/g aserrín consumido		
	Alcohol furfúrico	Cicloteno	Guayacol
0	100	55	55
10	75	100	100
20	44	45	55
30	40	43	50
40	38	46	55
50	36	45	48

(Fuente: Maga, 1987)

#### 4.1.3.4. Contenido de humedad de la madera

En la **Tabla 8** se muestra la relación entre el contenido de humedad de la madera con la cantidad de condensado, fenoles, ácidos y formaldehído y su calidad sensorial. Se puede observar que las maderas con un menor contenido de humedad son las que presentan mayor contenido en fenoles, ácidos y carbonilos (formaldehído). No obstante, cabe aclarar que la fracción del condensado recogido también varía. Con lo cual, si los datos fueran calculados bajo el mismo rendimiento, las maderas con humedad intermedia finalmente serían las que presentarían un mayor contenido en dichos componentes y mejor calidad sensorial (Maga, 1987).

**Tabla 8.** Influencia de la humedad de la madera en la composición química y las propiedades sensoriales

Contenido de humedad (%)	Cantidad/100 g de aserrín				Calidad sensorial
	Condensado (g)	Fenoles (mg)	Ácidos (mg)	Formaldehído (mg)	
1,8	28,2	263	3293	122	Insatisfactorio
21,5	41,5	136	3288	81	Buena
24,5	43,5	100	3003	78	Buena
31,2	32,8	33	890	-	Casi satisfactorio

(Fuente: Maga, 1987)

#### **4.1.3.5. Tamaño de la madera**

El tamaño de los trozos de madera que se utiliza en el proceso de pirólisis puede influir en las propiedades sensoriales del humo, debido a que cuanto mayor sea el tamaño de la partícula, mayor es la superficie expuesta, por lo tanto, mayor es el caudal de aire necesario para obtener la misma velocidad de combustión que una partícula más pequeña (Maga, 1987).

#### **4.1.3.6. Almacenamiento**

El almacenamiento produce cambios químicos en el HL que alteran sus propiedades sensoriales. En estudios de cuantificación periódica de la formación de metil acetato y formiato de metilo en HLs conservados a 25 °C, durante un período de 30 días demostraron que el metil formiato alcanzó un equilibrio en su contenido con tan sólo 70 horas, mientras que el metil acetato continuaba aumentando gradualmente luego de 700 horas de almacenamiento (Maga, 1987).

#### **4.1.3.7. Métodos de generación de humo**

El método de generación de humo puede modificar sustancialmente el contenido de HAPs y fenoles. Pöhlmann y col. (2013) estudiaron el efecto de los distintos métodos de generación de humo: “smouldering”; “vapor de humo” (vapor sobrecalentado a través de las astillas de madera) y “humo de fricción” (por fricción del tronco de madera) sobre la composición del mismo. Se concluyó que el método de “smouldering” produjo los mayores niveles de HAPs, mientras que el “humo de fricción” arrojó los menores. Por otra parte, el “vapor de humo” presentó bajos niveles de HAPs y relativamente altos en fenoles. Otras investigaciones, mostraron diferencias en las cantidades de compuestos volátiles y no volátiles al comparar humos generados con “aserrín” y por fricción (Maga, 1987).

Estos tratamientos se describirán con mayor detalle más adelante.

#### **4.1.4. Métodos de obtención**

Existen diversas técnicas para la elaboración de HLs debido a que cada etapa del proceso depende de múltiples factores que pueden ser ajustados y modificados; es decir, están sujetas a los objetivos y finalidades que se quieren alcanzar, ya sea minimizando los costos de producción como así también la obtención de un producto con características determinadas, entre otros.

En la **Figura 1** se puede observar un diagrama de elaboración típico el cual consiste de 6 etapas fundamentales: 1) Pretratamiento; 2) Generación de humo (pirólisis); 3) Condensación; 4) Separación; 5) Filtración y 6) Almacenamiento.

**Figura 1.** Diagrama de flujo de producción de HL



### 1) Pretratamiento

La materia prima (madera) se obtiene por el talado de árboles aptos para su uso y es trasladada por vehículos motorizados hasta los aserraderos donde los grandes troncos se convierten en pequeñas partículas (0,2-2mm). Dichos troncos son cortados y triturados por grandes máquinas especiales diseñadas para dicho fin, con el objetivo principal de incrementar la velocidad de transferencia de calor en la generación de humo, aumentando la superficie expuesta de las mismas (Xin y col., 2020). Luego, el producto obtenido, aserrín o astillas de madera (dependiendo el grado de triturado), es formulado combinando diferentes o múltiples fuentes del mismo tipo de biomasa para cumplir con las especificaciones deseadas (Xin y col., 2020).

A continuación, la biomasa sufre un proceso de secado el cual ocurre entre la temperatura ambiente y 150 °C aproximadamente, permitiendo reducir el contenido de humedad y como consecuencia, aumentando la eficiencia de transferencia de calor en la pirólisis (Xin y col., 2020). El calor perdido en esta etapa y la quema de sus subproductos puede reutilizarse debido a que el secado es un proceso de alto consumo energético (Xin y col., 2020). Un proceso alternativo al secado es la torrefacción, que se lleva a cabo a temperaturas muy bajas, generalmente entre 200-300 °C, bajo atmósfera inerte, produciendo principalmente agua y ácido acético (Wang y col., 2016 a).

## 2) Generación de humo

Una vez finalizada la primera etapa, el aserrín/astillas de madera son depositadas en reactores donde se produce la pirólisis (combustión incompleta de la materia orgánica en condiciones de atmósfera inerte) en la que la madera arde “sin llama” (no se quema) liberando los gases que se observan en el humo común (Junaidi y Nursyifa, 2020; Lingbeck y col., 2014; Xin y col., 2020; Simon y col., 2005). Los vapores, derivados de la despolimerización y fragmentación de la celulosa, hemicelulosa y lignina, son una mezcla de compuestos de diversos pesos moleculares que exhiben una amplia gama de puntos de ebullición, entre los cuales podemos encontrar ácidos carboxílicos y agua (fracción “ligera”), alcoholes, aldehídos, fenoles, ésteres, éteres, furanos y cetonas (fracción “media”), azúcares y oligómeros de lignina (fracción “pesada”) (Xin y col., 2020).

Estos gases pueden generarse mediante *a)* “smouldering” *b)* pirólisis convencional *c)* pirólisis rápida *d)* vapor de humo *e)* fricción y *f)* contacto.

*a)* Es la técnica más utilizada a nivel industrial. El proceso, que puede ser controlado por el suministro de aire, consiste en transferir las astillas de madera desde el contenedor de almacenamiento hasta el área de combustión con la ayuda de agitadores en el cual un filamento enciende las mismas alcanzándose temperaturas entre 500-800 °C (Xin y col., 2020; Pöhlmann y col., 2013).

*b)* En la pirólisis “lenta” convencional la biomasa se calienta a temperaturas cercanas a los 500 °C. Los vapores, que residen entre 5 y 30 min, no se escapan tan rápido como en la pirólisis “rápida”, lo cual permite que sus componentes continúen reaccionando entre sí mientras que el carbón sólido y otros líquidos se van formando (Mohan y col., 2006).

*c)* Es un proceso que ocurre a altas temperaturas cuidadosamente controladas (425-650 °C) y en ausencia de oxígeno. Las altas tasas de transferencia de calor y calentamiento hacen que se requiera una alimentación de biomasa de un grado finamente molido. Como se puede imaginar, la rapidez del proceso se debe a que el tiempo de residencia de los vapores en el reactor es muy pequeño, menor a 2 segundos. No se generan desechos ya que el bioaceite y el carbón sólido se pueden utilizar como combustible mientras que los gases pueden ser reciclados en el proceso (Mohan y col., 2006).

*d)* Es un proceso endotérmico que se produce canalizando el vapor sobrecalentado a través de las astillas de madera a temperaturas cercanas a los 400 °C. Es especialmente muy utilizado y adecuado para la producción de carnes ahumadas en caliente (Pöhlmann y col., 2013).

*e)* Es un proceso endotérmico en el que los troncos, sin tratamiento previo, son directamente empujados y presionados contra una rueda de fricción giratoria que actúa a intervalos con el fin de evitar sobrecalentamiento y combustión del tronco. La fricción conduce a un aumento en la temperatura de la superficie de la madera (300-400 °C) y en consecuencia en la temperatura de generación del humo (Pöhlmann y col., 2013).

f) Es una de las técnicas más innovadoras en las que placas de madera se ponen en contacto con placas calefactoras a fin de generar humo (Pöhlmann y col., 2013).

### 3) Condensación

Luego de la pirólisis se producen principalmente tres fracciones: vapores condensables, gases (no condensables) y sólidos (carbonización y cenizas). Los vapores salen del reactor y son rápidamente enfriados a través de condensadores tales como depuradores, baños de agua, intercambiadores de calor de tubo y coraza y torres de aspersión (Xin y col., 2020).

Los condensados “crudos” obtenidos son almacenados en grandes tanques para su intervención en la siguiente etapa.

### 4) Separación

La decantación de los condensados permite la separación de tres fases: una fase soluble en agua, la cual contiene gran parte de los compuestos responsables de las propiedades organolépticas del HL, una fase insoluble en agua de alta densidad (alquitrán), rica en fenoles y HAPs, y una fase oleosa que es descartada rápidamente debido a que su consumo humano está prohibido (Simon y col., 2005; Xin y col., 2020). La fase insoluble en agua, llamada fracción de alquitrán primaria, a su vez sufre un proceso de extracción y purificación/destilación con el fin de eliminar componentes tóxicos, es decir, reduciendo al mínimo los valores de HAPs (Simon y col., 2005; Xin y col., 2020; Lingbeck y col., 2014; Lombok y col., 2014). Ambas fases por lo tanto, constituyen en su totalidad el producto final.

### 5) Filtración

Luego de la separación, se lleva a cabo la filtración, generalmente mediante filtros HEPA (alta eficiencia de absorción de partículas) o FAP (filtros antipartículas), con el fin de eliminar cualquier tipo de impureza, contaminante o sólidos que pudieron haber permanecido en las distintas etapas de su producción (Narváez-Araujo, 2010).

### 6) Almacenamiento

Por último, el HL requiere un tiempo de envejecimiento (meses hasta incluso años) con el fin de mejorar las cualidades sensoriales y conferirle suavidad al producto final (Xin y col., 2020; Lingbeck y col., 2014). En esta etapa se forman oligómeros indeseables que se depositan en el fondo del contenedor (los cuales son eliminados en un filtrado final) y componentes menos ásperos (como ésteres) promovidos por la reacción entre los compuestos carbonílicos y alcoholes con los constituyentes presentes. El metanol reacciona con el ácido acético y fórmico formando ésteres con las características anteriormente mencionadas (Xin y col., 2020; Maga, 1987).



#### **4.1.5. Tipos de HL: Entero o refinado**

Podemos definir el HL refinado como aquel que se ha sometido a varias etapas seriadas de destilación/filtración mientras que el HL entero es aquel que ha sufrido una “única” etapa. Existen diferencias de composición entre ambos, que serán reflejadas en sus propiedades intrínsecas y por ende en el propósito de su uso. Entre ellas, una de las más importantes es el contenido de HAPs. El HL refinado se caracteriza por presentar valores muy bajos de HAPs, ya que una de sus finalidades en el proceso de elaboración, es reducir el contenido de los mismos (así como también de alquitrán) para asegurar la salud del consumidor (Simon y col., 2005; Junaidi y Nursyifa, 2020).

En la **Tabla 9** se puede observar cómo varía la concentración de benzopireno (HAP) al analizar tres HLs diferentes (siendo el grado 1 el más refinado y el 3 el de menor refinación) mostrando que el HL más refinado es el que presentó un menor contenido de benzopirenos (Mulyawanti y col., 2019).

**Tabla 9.** Contenido de benzopireno de tres HLs diferentes

<b>Grado</b>	<b>Benzopireno (ppm)</b>
1	13,316
2	16,103
3	25,203

(Fuente: Mulyawanti y col., 2019)

En la **Tabla 10** se puede apreciar una comparación entre HL comerciales con distintos grados de refinado. El HL entero (marca “Code 10-poly”) presentó mayor contenido en fenoles (y por ende, color más oscuro y con más aroma a humo) respecto a los HLs refinados (marca “AM-3”, “AM-10” y “1291”). Estos últimos los fenoles no fueron detectados, mientras que presentaron valores superiores de carbonilos en comparación al HL entero (Maulina y Sinaga, 2019; Montazeri y col., 2013 b). A su vez, el Code 10-poly exhibió niveles más altos de ácido acético y en consecuencia, presenta un pH más bajo (**Tabla 11**) (Maulina y Sinaga, 2019; Montazeri y col., 2013 a).

**Tabla 10.** Comparación en el contenido de compuestos orgánicos en HLs comerciales

<b>Marca de HL</b>	<b>Ácidos orgánicos (%)</b>	<b>Carbonilos (%)</b>	<b>Fenoles (%)</b>
Code 10-Poly	5,8	35,7	34,0
AM-3	1,0	74,0	0
AM-10	7,4	54,0	0
1291	2,3	70,3	0,1

(Adaptado de Maulina y Sinaga, 2019)

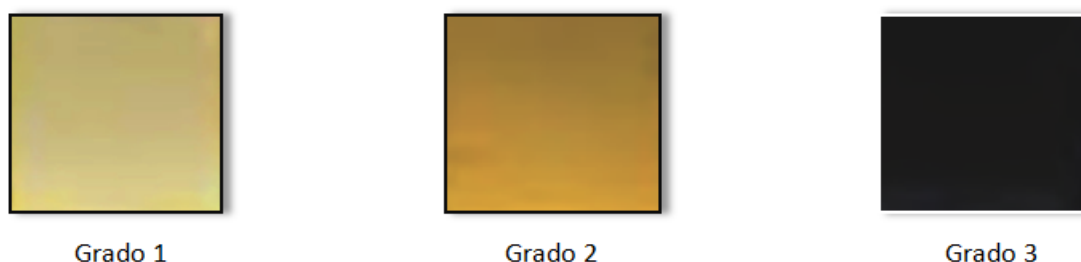
**Tabla 11.** Comparación en el contenido de ácido acético y pH en HLs comerciales

Marca de HL	Ácido acético (% p/p)	pH
Code 10-Poly	10,3	2,3
AM-3	1,8 – 2,1	4,25 – 4,85
AM-10	2,3	4,2
1291	0,7	5,7

(Adaptado de Maulina y Sinaga, 2019)

Por otro lado, en la **Figura 2** se pueden observar diferencias en el color entre los distintos grados del humo, el cual depende de la extensión de las etapas de filtración, siendo el 1 el de mayor y el 3 el de menor extensión, respectivamente (Kailaku y col., 2017). El cambio en el color desde el “negro”, pasando por el amarillo y luego por amarillo claro confirma la separación de la fracción ligera (fenoles, carbonilos y ácidos) de la fracción pesada (HAPs y alquitrán) (Kailaku y col., 2017; Junaidi y Nursyifa, 2020; Montazeri y col., 2013 a).

**Figura 2.** Comparación del color del HL de diferentes grados de filtración



(Adaptado de Kailaku y col., 2017)

#### **4.1.6. Legislación**

En el C.A.A (cap. XVIII; res n° 10/06), se considera al HL como un aditivo alimentario; un aromatizante/saborizante definido como “preparaciones concentradas, utilizadas para conferir aroma de humo a los alimentos”. Pueden ser producidos a partir de cortezas, ramas y maderas no tratadas de diversas especies tales como *Acer negundo L*, *Betula pendula Roth*, *Betula pubescens Ehrh*, *Carpinus betulus L*, etc., sometiendo las mismas a diferentes procesos de combustión controlada como “destilación seca a temperaturas comprendidas entre 300 y 800 °C o arrastre con vapor de agua recalentado a una temperatura entre 300 y 500 °C” seguida de la “separación de las fracciones obtenidas a fin de aislar los componentes aromáticos importantes”.

Dentro de las sustancias permitidas para su elaboración se nombran las siguientes: diluyentes y vehículos, antioxidantes, antiespumantes, secuestrantes, conservadores,

emulsificantes y estabilizantes, reguladores de acidez, resaltador de sabor, antihumectantes/antiaglutinantes y colorantes. Las mismas *“deben responder, por lo menos, a los requisitos de identidad y pureza y a las demás especificaciones que se determinen en relación a los alimentos en general y/o a los aromatizantes en particular”* y *“no será necesario declarar el nombre de cada sustancia que compone el aromatizante/saborizante, siendo suficiente designarlo en conjunto con la palabra “aromatizante(s)/saborizante(s)”, indicando su clasificación como natural, idéntico al natural o artificial, según corresponda”*.

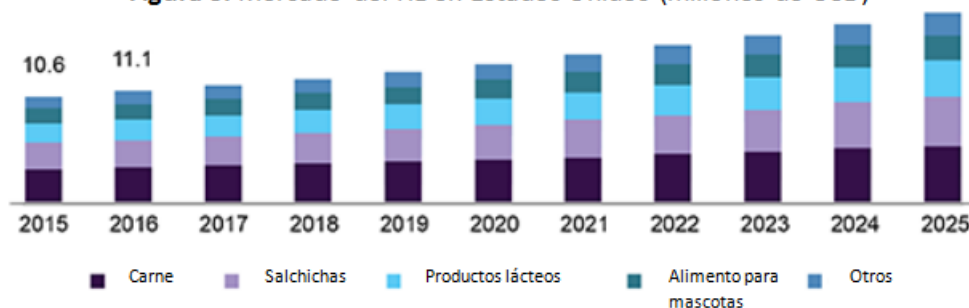
Para la obtención de los extractos naturales se pueden utilizar diversos solventes como hexano, propano, tolueno, etc. y la concentración de sus residuos no debe superar los valores máximos establecidos en los alimentos listo para su consumo. Como se mencionó previamente, *“no deben transferir más de 0,03 ug/kg de 3,4-benzopireno al alimento final, determinado a partir de la concentración del 3,4-benzopireno presente en el aromatizante/saborizante de humo utilizado, y en función de la dosis (cantidad) de éste aplicada en el alimento o producto listo para el consumo”*.

#### **4.1.7. Usos del HL en alimentos**

El HL se utiliza principalmente como saborizante para conferirle aroma y sabor ahumado característico a una amplia gama de alimentos a nivel doméstico e industrial tales como: embutidos (salchichas), carnes, charqui, tocino, jamón, pescados (salmón, trucha), lácteos como quesos (tofu, gouda), condimentos (chile), snacks (papas fritas), salsas/marinadas e incluso bebidas como whisky (Basmatic, 2018; Franca y Luiz, 2019; Riches, 2020). Además del color, sabor y aroma tan característico que brinda, se lo utiliza como conservante al incorporar compuestos antimicrobianos y antioxidantes alargando la vida útil de los mismos (Aguilar, 2020).

De los alimentos anteriormente mencionados, las carnes son en general las más populares a la hora de incursionar con nuevos aromas y sabores mediante el agregado de HL. La **Figura 3** muestra estudios de mercado en Estados Unidos, donde las mayores ventas y en consecuencia, la mayor demanda del HL existe en el sector de las carnes, seguido de las salchichas y por último de los lácteos, donde si bien la proporción entre ellos se mantiene casi constante a lo largo de los años, su uso aumentó respecto del año 2015, previéndose una suba en su consumo/uso.

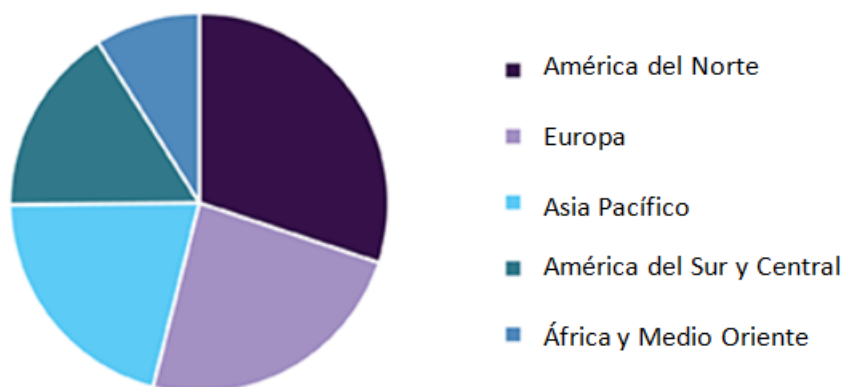
**Figura 3.** Mercado del HL en Estados Unidos (millones de USD)



(Fuente: Grand View Research, 2019)

A su vez, la **Figura 4** indica que América del Norte es la principal región del mundo en el mercado del HL seguido por Europa y Asia Pacífico, y por último por América del Sur y Central y África y el Medio Oriente.

**Figura 4.** Mercado global del HL por región 2018 (%)



(Fuente: Grand View Research, 2019)

#### **4.1.8. Relevamiento de productos alimenticios con HL en el mercado argentino y mundial**

Como se ha mencionado anteriormente, el uso de HL en los alimentos, a nivel doméstico e industrial, es una tendencia que ha ido en aumento a lo largo de los últimos años y alrededor del mundo, debido a la demanda por parte de los consumidores de productos ahumados.

En la **Tabla 12** se muestran algunos ejemplos de productos alimenticios saborizados con humo que se venden a nivel local y mundial. Como es de esperar, sus principales usos son en carnes, salchichas y embutidos, seguido de pescados, salsas y especias. Es necesario señalar que de todos los productos relevados, solamente el aceto producido por Geson contiene HL como tal.

En todos los demás casos se desconoce el método utilizado en la aplicación del mismo, denominándolos simplemente como “ahumado” o “con saborizante de humo”.

**Tabla 12.** Empresas que elaboran alimentos ahumados a nivel mundial

<b>Empresa</b>	<b>Productos ahumados</b>	<b>Fuente</b>
Alfa Argentina S.A	panceta, lomo, salchichas, mortadela, salchichón, fiambres para emparedados y embutidos frescos	<a href="http://alfaargentina.com/">http://alfaargentina.com/</a>
Geson	chimichurri y aceto con HL	<a href="https://www.geson.com.ar/">https://www.geson.com.ar/</a>
San Giorgio	condimento, pimentón, salsa chipotle y salsa barbacoa	<a href="https://www.geson.com.ar/">https://www.geson.com.ar/</a>
Paladini	panceta salada cocida, salchichas tipo viena y salchichas con espinaca y zanahoria	<a href="https://www.paladini.com.ar/es/home/">https://www.paladini.com.ar/es/home/</a>
Friolim	salchicha y pastrón	<a href="http://www.friolim.com.ar/">http://www.friolim.com.ar/</a>
Granjas Patagónicas	ajo laminado, paprika, curry, sal, pimentón, masala, mostaza, almendras, cebollines, trucha salmón, ciervo, jamón crudo y queso	<a href="https://www.granjaspatagonicas.com.ar/">https://www.granjaspatagonicas.com.ar/</a>
B&G Foods	mezcla de cerdo desmenuzado, salsa para condimentar pollo y costillas de cerdo, salsa de tomate y tocino	<a href="https://bgfoods.com/">https://bgfoods.com/</a>
Ahumados Domínguez	salmón, bacalao y trucha	<a href="https://www.ahumadosdominguez.es/es/">https://www.ahumadosdominguez.es/es/</a>

#### **4.1.9. Propiedades del HL**

##### **4.1.9.1. El HL como antioxidante natural**

Las reacciones de oxidación originan radicales libres que dañan gravemente las células y en consecuencia, generan grandes cambios físicoquímicos en los alimentos impactando en la vida útil de los mismos. Por este motivo, hoy en día se buscan diferentes alternativas mediante nuevas tecnologías para minimizar dicha problemática a través del uso de agentes antioxidantes

naturales, “sustancias que retardan la aparición de alteración oxidativa del alimento” (C.A.A, cap. XVIII; res n° 083/93).

La capacidad antioxidante del HL es resultado de la contribución de todos los componentes fenólicos presentes en él, tales como guayacol, siringol, eugenol, dihidroxibenzenos, entre otros (Soldera y col., 2008). Dicha propiedad no sólo se debe a la formación de compuestos estables durante el proceso de oxidación de las macromoléculas, sino también de su carácter lipofílico, que ayudaría a su vez a penetrar en la membrana lipídica aumentando su eficiencia como antioxidante (Kjällstrand y Petersson, 2001 a; Kjällstrand y Petersson, 2001 b; Pokorny y col., 2001).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos ha sido demostrada en diversos estudios (Rice-Evans y col., 1997; Shahidi y col., 1992). En particular, ensayos de peroxidación lipídica probaron que metoxifenoles presentes en los humos de madera tienen un alto poder antioxidante, además de compartir características estructurales similares con antioxidantes fisiológicos como ubiquinol y tocoferoles (Kjällstrand y Petersson, 2001 b). También, oligómeros de lignina demostraron ser agentes con una alta capacidad antioxidante (Guillén e Ibargoitia, 1998).

En un estudio sobre la aplicación de HL en tocino se determinó la capacidad del mismo para secuestrar radicales libres mediante el ensayo de DPPH, alcanzando valores de concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ) igual a 0,24 mg/ml, el cual es considerado satisfactorio con respecto al antioxidante comercial butilhidroxitolueno (BHT) ( $IC_{50} = 0,05$  mg/ml) (Soares y col., 2016). Cuanto menor es el valor de  $IC_{50}$ , mayor es la capacidad antioxidante de un compuesto.

#### **4.1.9.2. El HL como antimicrobiano natural**

La contaminación microbiológica es la principal causa del deterioro de los alimentos y por esta razón es de sumo interés controlarla. El uso de agentes antimicrobianos en los alimentos es una de las tantas posibilidades para evitar el crecimiento de microorganismos y prolongar la vida útil de los mismos. En consecuencia, el estudio de las características antimicrobianas intrínsecas del HL es de mucha importancia, siendo éste un potencial antimicrobiano natural.

La eficiencia de los HLs como agentes antimicrobianos se debe a la presencia de sus constituyentes tales como fenoles, carbonilos y ácidos orgánicos que alteran la permeabilidad de la membrana celular generando graves daños irreversibles (Soares y col., 2016; Lingbeck y col., 2014; Milly, 2003; Vitt y col., 2001; Toledo, 2007; Widayat y col., 2018). Estos efectos están relacionados con la concentración de los mismos, con el tipo de compuesto y con el microorganismo sobre el cual es probado (Suñen y col., 2001; Milly, 2003).

Suñen (1998) demostró que los HLs que tenían una mayor concentración de fenoles (94-153 mg/kg), fueron los que presentaron mayor actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y otros microorganismos patógenos. Sin embargo, la fracción con la concentración más alta de fenoles no fue la más efectiva como se esperaba y de hecho, aquella que presentaba altos valores en fenoles, pero no los más altos de todas las muestras (21 mg/kg), tenía a su vez la concentración de ácidos más alta de todas (34 mg/kg). Dicho autor concluyó que si bien ambos

componentes presentaban actividad antimicrobiana, la combinación de ambos potenciaba su capacidad y eran responsables de la misma.

Otras investigaciones no relacionaron la actividad antimicrobiana directamente con la concentración de fenoles, sino con la concentración de los ácidos presentes en el HL. La fracción de menor contenido de fenoles pero mayor en ácidos, fue la que presentó una actividad antimicrobiana más alta, mientras que fracciones con niveles de fenoles elevados fueron las menos efectivas, sugiriendo que la concentración de éstos últimos no eran indicativos de la actividad antimicrobiana del HL (Suñen y col., 2001).

Lingbeck y col. (2014) estudiaron el efecto de distintas fracciones de HL sobre *Listeria innocua* en ensayos de difusión en disco. Dichos autores demostraron que aunque algunas de ellas presentaban valores de fenoles relativamente muy bajos (indetectables), reducían la carga microbiana, sugiriendo nuevamente que los ácidos y carbonilos eran los responsables de su actividad.

Otros estudios han demostrado que fracciones con niveles altos en carbonilos y bajos en pH (pH=1) fueron las más efectivas contra microorganismos patógenos y organismos que deterioran los alimentos, confirmando nuevamente que no sólo los fenoles presentan dicha capacidad (Milly y col., 2005).

Además, la capacidad antimicrobiana del HL como tal (sin referirse a un componente en especial) ha sido confirmada en diversos estudios frente a una amplia gama de microorganismos Gram positivos, Gram negativos, levaduras y mohos tales como: *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella Seftenburg*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* (Milly y col., 2005; Dien y col., 2019; Desvita y col., 2021; Fraise y col., 2013; Suñen y col., 2001; Lingbeck y col., 2014).

#### **4.1.9.3. Mecanismos de acción sobre agentes oxidantes**

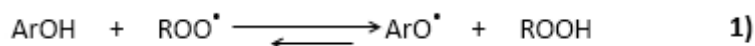
A partir del mecanismo por el cual actúan los agentes antioxidantes es posible conocer con más detalle cómo interactúan las moléculas entre ellas. Los compuestos fenólicos presentes en el HL exhiben dos tipos de mecanismos, perteneciendo a las clases de “antioxidantes” propiamente dichos y “estabilizadores de hidroperóxidos” (Tabla 13) (Pokorny y col., 2001).

**Tabla 13.** Mecanismo de acción de antioxidantes

Clases de antioxidantes	Mecanismo de acción	Ejemplo de antioxidantes
Antioxidantes	Inactivando radicales libres lipídicos	Fenoles
Estabilizadores de hidroperóxidos	Previendo la descomposición de hidroperóxidos en radicales libres	Fenoles
Sinergistas	Promoviendo la actividad propia de los antioxidantes	Ácido cítrico, ascórbico
Secuestradores de metales	Uniendo metales pesados en componentes inactivos	Ácido fosfórico, compuestos de Maillard, ácido cítrico
Secuestradores de oxígeno singlete	Transformando el oxígeno singlete en oxígeno triplete	Carotenos
Sustancias que reducen hidroperóxidos	Reduciendo hidroperóxidos de modo no radicalario	Proteínas, aminoácidos

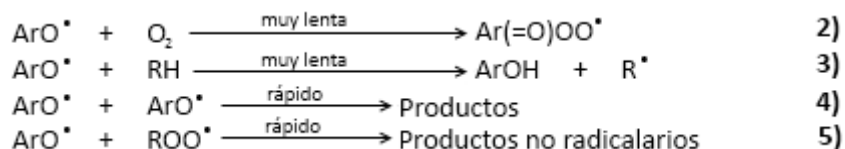
(Fuente: Pokorny y col., 2001)

Los fenoles inhiben la oxidación transfiriendo un átomo de hidrógeno (H) a los radicales peroxi (ROO•) formados en la etapa de propagación de la peroxidación lipídica (1) (Pokorny y col., 2001).



Este mecanismo implica la formación previa de un puente de hidrógeno complejo entre ArO - H y un par solitario en el O• del ROO•. Luego, el H se transfiere como un protón entre los dos átomos de oxígeno (O) y un electrón se mueve simultáneamente desde el par solitario 2p del O en el fenol, al orbital que contiene el electrón desapareado en O• de ROO• (Pokorny y col., 2001).

El radical ariloxilo estabilizado por resonancia (ArO•) generado en (1), generalmente no reacciona con el oxígeno molecular y el sustrato (2 y 3). De hecho la etapa de terminación de la oxidación ocurre por las reacciones 1 y 5 (la 4 también termina la cadena si la 3 no ocurre) (Pokorny y col., 2001; Foti, 2007).





#### 4.1.9.4. Mecanismos de acción sobre microorganismos

La estructura celular bacteriana es el principal foco de atención de la acción antimicrobiana y puede ser descrita en general por tres mecanismos: *a)* reacción con la membrana celular aumentando la permeabilidad y favoreciendo la liberación de los componentes celulares; *b)* inactivación de enzimas esenciales y *c)* destrucción o inactivación funcional del material genético. La reversibilidad por parte de la célula frente a estos mecanismos va a determinar el poder bacteriostático y/o letalidad de los antimicrobianos (Davidson y Branden, 1981; Dien y col., 2019).

##### Fenoles

Muchos autores concuerdan en que el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos se debe principalmente a la interacción de los mismos con la membrana celular, produciendo en ella pérdida de integridad, aumento de la permeabilidad y en consecuencia, la liberación de los constituyentes intracelulares provocando finalmente la lisis celular; un daño irreversible para el microorganismo (Davidson y Branden, 1981; Kailaku y col., 2017; Dien y col., 2019; Lingbeck y col., 2014).

A su vez, se cree que la inhibición enzimática es otro de los mecanismos mediante los cuales pueden actuar los fenoles. Davidson y Branden (1981) comprobaron que la etapa limitante estaba vinculada con la penetración del compuesto al interior de la célula y relacionada con su lipofilicidad.

En muchos casos, el mecanismo de acción podría deberse a la combinación de ambos procesos anteriormente mencionados (Davidson y Branden, 1981).

##### Carbonilos

Los compuestos carbonílicos inhiben el crecimiento microbiano al penetrar en la célula e inactivar enzimas localizadas en el citoplasma y en la membrana citoplasmática. Actúan condensándose principalmente con los grupos aminos libres de los aminoácidos básicos de las cadenas laterales de los polipéptidos. Estos grupos amino pueden ser una parte esencial del sitio activo de la enzima o pueden participar en la unión del sustrato mediante puentes de hidrógeno. Incluso cuando los carbonilos no pueden ingresar en el interior de la célula pueden interferir en la absorción de nutrientes de diversas maneras: *a)* condensación con aminoácidos o amoníaco disminuyendo la concentración de los mismos en el medio; *b)* formación de una red tridimensional que aísla físicamente a los sustratos (en bacterias putrefactas o mohos que excretan proteasas/glucanasas al medio extracelular) y *c)* modificación de sustratos en general (Lingbeck y col., 2014).

##### Ácidos

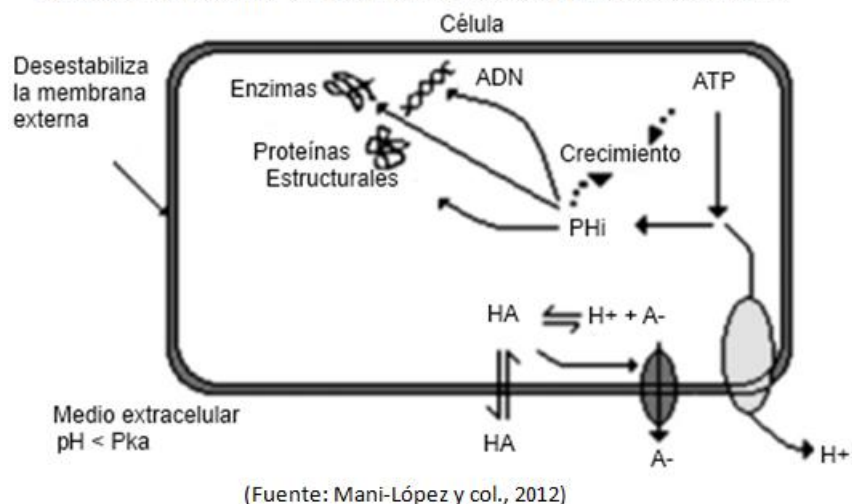
Los ácidos presentes en el HL destruyen microorganismos bajo dos mecanismos de acción (**Figura 5**): *a)* acidificación del citoplasma y agotamiento de la energía celular y *b)* acumulación de

su forma disociada hasta niveles tóxicos (Mani-López y col., 2012). Los mismos se detallan a continuación:

a) Al ingresar los ácidos en el interior de la célula, el medio intracelular alcalino favorece la disociación del ácido liberando el protón ( $H^+$ ) y su correspondiente anión ( $A^-$ ). La célula comienza a expulsar el protón hacia el medio extracelular a través de un transporte activo (requiere de energía) intercambiándolo por otro catión (sodio, potasio) a modo de mantener el pH intracelular (homeostasis) (In y col., 2013; Mani-López y col., 2012; Milly, 2003). Esto se ve reflejado en una distorsión de las capacidades energéticas celulares siendo incapaz de realizar las vías metabólicas necesarias para su correcto funcionamiento lo cual provoca la muerte celular (Milly, 2003).

b) La presencia de niveles altos de ácidos orgánicos afectan no sólo la actividad enzimática al alterar su pH óptimo sino también la síntesis de ADN y ARN al interactuar con ellos, desencadenando un mal funcionamiento en la síntesis de los componentes celulares provocando la muerte celular (In y col., 2013; Mani-López y col., 2012).

**Figura 5.** Mecanismo de acción de los ácidos presentes en el HL



#### 4.1.9.5. Usos potenciales del HL en alimentos

El HL se utiliza principalmente con la intención de conferirle sabor, color y aroma ahumado característico a los alimentos, sin embargo éstos no son los únicos objetivos de su aplicación (Estrada-Muñoz y col., 1998; Maulina y Sinaga, 2019). El uso de HL presenta varias ventajas con respecto al ahumado tradicional que no son menos importantes. Entre ellas podemos nombrar, la facilidad de aplicación (dosificación), menores tiempos y velocidad de ahumado, menores costos de elaboración, aumento de la producción al omitir etapas del proceso, eficiencia en el control de contaminantes como HAPs por omisión o reducción a nivel alimentario y ambiental, promover la seguridad del personal (evitando riesgos de incendio), mayor diversidad de aplicaciones en los sistemas alimentarios, entre otras (Lingbeck y col., 2014; Narváez-Araujo, 2010; Pilevar y col.,

2017; Revista Ialimentos, 2015; Soares y col., 2016).

Actualmente, su capacidad antioxidante y antimicrobiana es el impulso que atrae a muchos científicos a estudiar sus propiedades intrínsecas innovando en la aplicación del mismo en diversas matrices alimentarias con el fin de minimizar la descomposición/deterioro, alargando su vida útil. Las diferencias exhibidas entre HLs refinados y enteros hacen posible a su vez el despertar de la curiosidad de investigadores al combinar estos dos en tales proporciones que permitan conseguir sus objetivos en cuestión.

Su incorporación como compuesto activo en películas biodegradables es de gran interés en la industria y a nivel científico, ya que se evita el agregado de aditivos en la formulación de los alimentos y podría mejorar la seguridad alimentaria, preservando la calidad del producto alimenticio envasado debido a su capacidad antimicrobiana y antioxidante. A su vez, su incorporación en películas biodegradables es de gran atractivo debido a que no sólo el agregado de HL en estas películas altera de forma positiva las propiedades mecánicas de las mismas, sino también que en el caso de usar HL refinado (bajos niveles en fenoles) no se alteraría el olor del producto envasado, como puede ocurrir con el uso de aceites esenciales utilizados comúnmente en la elaboración de películas activas biodegradables. Estos compuestos de alta volatilidad, poseen un intenso aroma que podrían alterar las características sensoriales del producto en contacto con ellos (Wang y col., 2016 b; Soazo y col., 2016; Elizari Reta, 2013).

#### **4.1.9.6. Comparación con agentes antioxidantes de origen natural**

La capacidad antioxidante de los agentes naturales como orégano, tomillo y romero puede atribuirse principalmente a los fenoles presentes en su composición tales como, carvacrol y ácido rosmarínico, timol y rosmanol respectivamente (Elizari Reta, 2013; Zheng y Wang, 2001; Nakatani, 1992).

Muchos estudios han demostrado su capacidad antioxidante incluso arrojando valores muy similares a los antioxidantes químicos más utilizados a nivel industrial como BHT y  $\beta$ -hidroxiácido (BHA), así como también a antioxidantes naturales como tocoferoles (Acevedo y col., 2007; Zheng y Wang, 2001; Nakatani, 1992).

En la **Tabla 14** se compara la actividad antioxidante del orégano y romero con dos HLs comerciales (S2 y S12). Se observa que el  $IC_{50}$  del orégano es similar al HL S2, como también el romero presentó valores semejantes al HL S12. Estos resultados demuestran que ambos antioxidantes naturales (HL y aceites esenciales de especias) presentan gran actividad cuando son comparados con BHT y BHA ( $IC_{50}$  de 0,05 y 0,17 mg/ml, respectivamente) (Soares y col., 2016) confirmando su uso potencial en alimentos.

**Tabla 14.** Capacidad antioxidante de orégano, romero y dos HLs comerciales determinada por ensayo DPPH

Agente antioxidante	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	Fuente
Orégano	1,4	Alvarez y col., 2019
Romero	39,8	Alvarez y col., 2019
HL S2	1,3	Soares y col., 2016
HL S12	46,8	Soares y col., 2016

#### 4.1.9.7. Comparación con antimicrobianos de origen natural

Los aceites esenciales de orégano y tomillo demostraron ser capaces de desintegrar la membrana externa hidrofílica de la pared celular de *S. typhimurium* en concentraciones de 0,06% y presentaron potente actividad frente a *E. coli* y *L. monocytogenes* (Araujo, 2019; Alvarez y col., 2019; Panizzi y col., 1993; Rasooli y col., 2006). Mientras que estudios de diversas especies de tomillo presentaron actividad microbiana frente a virus, bacterias y hongos, el orégano manifestó dicha capacidad frente a una amplia gama de microorganismos tales como *L. innocua*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Salmonella pullorum*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Yersinia enterocolitica*, entre otros (Rasooli y col., 2006; Mathlouthi y col., 2012; Baratta y col., 1998).

Por otro lado, el aceite esencial de romero resultó ser efectivo frente a *S. indiana*, *L. innocua* y *E.coli*, siendo letal para éste último (Mathlouthi y col., 2012; Alvarez y col., 2019). Además, presentó actividad frente a *S. typhimurium*, *S. aureus*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *L. plantarum*, *Micrococcus luteus*, entre otros (Alvarez y col., 2019; Baratta y col., 1998).

En la **Tabla 15** se comparó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales (orégano y romero) y HL sobre *S. aureus*, en ensayos realizados por distintos autores en los que se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). El aceite esencial de orégano exhibió menores valores de CMI y CMB que el aceite esencial de romero. Mientras que ambos alcanzaron valores de CMI y CMB considerablemente menores que el HL, indicando que éste último sería menos efectivo que dichos aceites. No obstante, se debe recordar que la capacidad antimicrobiana del HL depende de diversos factores como el proceso de elaboración/obtención, madera utilizada, temperatura, etc., que influyen significativamente en su composición química y en consecuencia, en dicha capacidad.

**Tabla 15.** Comparación de la capacidad antimicrobiana de tres antimicrobianos naturales distintos frente a *S. aureus*

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>CMI (mg/ml)</b>	<b>CMB (mg/ml)</b>	<b>Fuente</b>
Aceite esencial de orégano	<i>S. aureus</i>	0,24	0,48	Alvarez y col., 2019
Aceite esencial de romero	<i>S. aureus</i>	0,91	1,40	Alvarez y col., 2019
HL	<i>S. aureus</i>	5,5	8,0	Pilevar y col., 2017

Las características mencionadas anteriormente ponen de manifiesto la capacidad del HL de actuar como agente antimicrobiano y antioxidante. Debido a ello, los científicos buscan alternativas y nuevas tecnologías de aplicación a nivel alimentario para aprovechar y explotar su riqueza inherente. De este modo, es posible y prometedora la utilización del mismo como agente activo en películas, al proteger y brindar calidad y seguridad al alimento alargando su vida útil.

## **4.2. Películas biodegradables a base de pared celular de levadura**

### **4.2.1. Películas biodegradables**

#### **4.2.1.1. Descripción**

Las investigaciones en el área de los materiales se han enfocado a buscar alternativas a los polímeros sintéticos tradicionalmente utilizados en la elaboración de películas con la finalidad de reducir el impacto en el medio ambiente debido a las exigencias actuales (Delgado y col., 2018 a). La elaboración de películas biodegradables a base de componentes naturales puede ser una de las muchas respuestas a dicha problemática.

Una película biodegradable se puede definir como una estructura delgada, como una membrana, que solidifica en condiciones ambientales o controladas, y que está conformada por biopolímeros y compuestos plastificantes adecuados, y que puede servir de envoltorio al ser aplicado sobre el producto (Escobar y col., 2009; Santiago Santiago, 2015).

La biodegradabilidad es la capacidad de un material de ser degradado por acción de los microorganismos, es decir, perder sus propiedades y características originales por acción biológica. Las películas biodegradables se descomponen principalmente en sustancias sencillas como agua, dióxido de carbono y más complejas como biomasa (mediante la acción enzimática de bacterias, hongos, etc.) al ser expuestas durante un tiempo (semanas, meses) en condiciones determinadas de humedad, flora microbiana y oxígeno (Parzanese, 2010; Ccopa Mamani, 2014).

Para la formación de las películas se requiere únicamente de tres elementos: un polímero, un solvente (generalmente agua) y un agente plastificante. Dentro de las macromoléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza, las proteínas, los polisacáridos y los lípidos son los componentes de mayor aplicación. Los agentes plastificantes son fundamentales para reducir la fragilidad de las películas (causadas por fuerzas intermoleculares) mejorando la flexibilidad y extensibilidad, debido a la movilidad de las cadenas (Peltzer y col., 2018 b; Han, 2014).

El método tradicional más utilizado en la elaboración de las mismas se conoce con el nombre de "*casting*". Consiste fundamentalmente en la obtención de una dispersión uniforme compuesta por biomoléculas (proteínas, polisacáridos y/o lípidos o una mezcla de estos tres), el plastificante y el agua, que es vertida sobre una placa de material inocuo (acero inoxidable o polipropileno) y sometida luego, a un proceso de secado donde se evapora el solvente a temperatura y humedad controlada (Parzanese, 2010; Escobar y col., 2009).

#### **4.2.1.2. Fuentes**

La naturaleza, rica y abundante, nos brinda infinidad de recursos, los cuales son aprovechados por el ser humano para promover el bienestar en común, desarrollando nuevas tecnologías e innovando en la industria alimenticia y en el ámbito de los materiales. Dentro de dichos recursos, existen cuatro fuentes de elaboración de películas biodegradables a base de biopolímeros: animal, vegetal, algas y microorganismos.

#### 4.2.1.2.1. Animal

##### Caseína

Es la proteína de mayor abundancia en la leche de todos los mamíferos y se obtiene por la precipitación de la misma, siendo insolubles en agua (Elizari Reta, 2013). Las películas de caseinato puro son atractivas para su uso en alimentos debido a su transparencia, flexibilidad y solubilidad en agua (Arrieta y col., 2014; Hernández Silva y Guzmán Martínez, 2009).

##### Colágeno

Es el mayor constituyente de la piel, tendones y tejidos conectivos, y se encuentra extensamente distribuido en las proteínas fibrosas de los animales (Parzanese, 2010). Las películas a base del mismo son resistentes, altamente biodegradables, con buenas propiedades mecánicas y de barrera (Núñez Solís, 2014).

##### Proteínas del suero lácteo

Son solubles en agua y es la segunda fracción más importante (seguida de la caseína) en la composición proteica de la leche de los mamíferos y se obtiene como residuo durante la coagulación de las caseínas en la fabricación de quesos (Elizari Reta, 2013). A diferencia del caseinato, las películas de proteínas del suero son insolubles en agua debido a la presencia de enlaces covalentes de puentes de disulfuro (Hernández Silva y Guzmán Martínez, 2009).

##### Quitina y quitosano

La quitina es el polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. La principal fuente es el exoesqueleto (caparazones) de numerosos crustáceos como camarones, langostas y cangrejos obtenidos fácilmente como desechos de las plantas marítimas procesadoras. El quitosano a su vez se obtiene mediante un proceso de desacetilación química o enzimática de la quitina (Parzanese, 2010). Las películas a base de éste último, son transparentes y presentan buenas propiedades de barrera frente al agua y buena flexibilidad (Rivero y col., 2012; Balau y col., 2004).

#### 4.2.1.2.2. Vegetal

##### Almidón

Los almidones se obtienen de la papa, arroz, trigo, maíz, etc. y son muy utilizados en la elaboración de películas comestibles debido a su elevada biodisponibilidad, bajo costo, biodegradabilidad, renovabilidad y rendimiento (Bof y col., 2015; Versino y García, 2014; Parzanese, 2010).

### Derivados de la celulosa

Son considerados buenos agentes formadores de películas sólidas, con buenas propiedades mecánicas, baja permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, resistentes a los aceites y a la mayoría de los solventes orgánicos no polares debido a su estructura lineal (Romano y col., 2016; Parzanese, 2010). Los materiales de embalaje ampliamente utilizados, como el cartón y el papel (constituidos por celulosa) presentan excelentes propiedades mecánicas, pero su naturaleza hidrofílica son un problema en el envasado de alimentos húmedos (Cyras y col., 2007).

### Pectinas

Corresponden a un grupo complejo de polisacáridos estructurales que están presentes en la mayoría de las plantas, principalmente en los cítricos (Parzanese, 2010). Películas a base de las mismas presentan propiedades mecánicas y de permeabilidad aceptables (López y col., 2019; Sánchez Aldana y col., 2015).

### Zeína

Es una prolamina y la principal proteína de reserva del maíz. Se caracteriza por ser un material relativamente hidrofóbico y termoplástico por lo cual forman películas fuertes, con brillo, resistentes al ataque microbiano e insolubles en agua (Parzanese, 2010).

### Proteína de soja

Están compuestas por una mezcla de albúminas y globulinas, las cuales el 90% son proteínas de almacenamiento con estructura globular, formadas por globulinas 7s,  $\beta$ -conglucina, y globulina 11s, o glicina (Denavi y col., 2009). Exhiben buenas propiedades formadoras de películas, aunque son frágiles, coloridas y presentan pobres propiedades mecánicas (Mauri y Añón, 2008; Mauri y Añón, 2006).

#### 4.2.1.2.3. Algas

### Alginatos

Se obtienen de diferentes especies de algas, principalmente de *Macrocystis pyrifera*. Se utiliza generalmente en pescados, productos cárnicos frescos o congelados para evitar su deshidratación superficial (Parzanese, 2010). Las películas a base de alginatos son solubles en agua (alginato de sodio) y solubles en aceite (alginato de calcio) y presentan un sin número de aplicaciones, principalmente debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad (Fernando y Duque, 2014; Avendaño-Romero y col., 2013).

### Carragenanos

Se extraen industrialmente de diversas especies de algas rojas (como *chondrus* y *gigarina*). Al igual que los alginatos requieren de la adición de sales de calcio para la formación de geles y



películas, aplicándose principalmente en algunos frutos para retardar la pérdida de humedad y evitar la oxidación debido a sus buenas propiedades de barrera frente al oxígeno (Hernández Silva y Guzmán Martínez, 2009; Parzanese, 2010).

#### 4.2.1.2.4. Microorganismos

##### *Polihidroxibutirato (PHB)*

Es un biopoliéster termoplástico que se obtiene de numerosas especies de bacterias a partir de la fermentación de la glucosa y la alimentación con ácido acético durante el almacenamiento. Produce excelentes películas para empaques sólo o en combinación con almidón (Villada y col., 2007; Cyras y col., 2007).

##### *Polihidroxialcanoato (PHA)*

Es un biopoliéster lineal que se obtiene generalmente por la acción de *Pseudomona aeruginosa* (y algunas microalgas) como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía. Producen excelentes películas para empaques y permite controlar el CO<sub>2</sub> durante el almacenamiento de frutas y verduras (Villada y col., 2007; García y col., 2013).

##### *Ácido poliláctico (PLA)*

Es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino producido por la fermentación de azúcares simples. Sus películas presentan propiedades mecánicas superiores al poliestireno (PS) y similares al teraftalato de polietileno (PET) (a excepción de una baja elongación). Se utilizan como envase para la protección de cultivos en estadios primarios y productos de corta vida (Franco, 2011; Hernández Silva y Guzmán Martínez, 2009).

##### *Pululano*

Es un polisacárido extracelular bacteriano producido a partir de almidón mediante el hongo *Aureobasidium pullulans*. Las películas de pululano son claras, inoloras, insaboras y presentan buenas propiedades de barrera frente al oxígeno (Hernández Silva y Guzmán Martínez, 2009).

##### *Celulosa bacteriana*

Es un polímero extracelular insoluble que es producido por varias especies de bacterias como las pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina* (Santos y col., 2015). Las propiedades emulsificantes, cohesivas y de absorción, además de no provocar reacción alérgica en la elaboración de alimentos, le auguran a la celulosa bacteriana un futuro promisorio (Pacheco y col., 2019). De hecho, las películas a base de celulosa bacteriana presentan buenas propiedades mecánicas y una estructura firme con un grado de polimerización elevado (Retegi y col., 2010).

### Biomasa de levadura

Se entiende por biomasa a la concentración de microorganismos expresada en gramos de células secas por litro de cultivo. La biomasa de levadura es una fuente viable de biopolímeros como proteínas y polisacáridos con gran capacidad para formar películas. Las películas a base de biomasa de levadura son translúcidas, de color amarillo-amarronado y además presentan buenas propiedades mecánicas (Rezzani, 2018; Peltzer y col., 2018 b; Delgado y col., 2018 a).

#### **4.2.1.3. Legislación**

A pesar de que no existe en literatura una definición específica acerca de las películas biodegradables bajo un marco legal, se las puede definir como envases alimentarios, es decir *“artículos que están en contacto directamente con alimentos destinados a contenerlos desde su fabricación hasta su entrega al consumidor con la finalidad de protegerlos de agentes externos de alteración y contaminación, así como de adulteración”* (C.A.A, cap. IV; res n° 003/92). Al estar en contacto directo con los alimentos que lo contienen, los envases *“no cederán sustancias indeseables, tóxicas o contaminantes, que representen un riesgo para la salud humana, en cantidades superiores a los límites de migración total y específica”* (C.A.A, cap. IV; res n° 056/92).

Es de suma importancia tener en cuenta la migración de los componentes de los envases y equipamientos plásticos con el fin de conservar la inocuidad de los alimentos. Los límites de migración total, *“cantidad máxima admisible de componentes del material en contacto con los alimentos transferida a los simulantes bajo condiciones de ensayo”*, que deberán cumplir los mismos (C.A.A, cap. IV; res n° 056/92) son:

- *“50 mg/kg. de simulante, en el caso de envases y equipamientos con capacidad superior o igual a 250 ml en el caso de envases y equipamientos en que no sea posible estimar el área de superficie en contacto y en el caso de elementos de cierre u objetos de área pequeña”.*
- *“8 mg/ dm<sup>2</sup> de área de superficie del envase, en el caso de envases y equipamientos con capacidad inferior a 250 ml y en el caso de material plástico genérico”.*

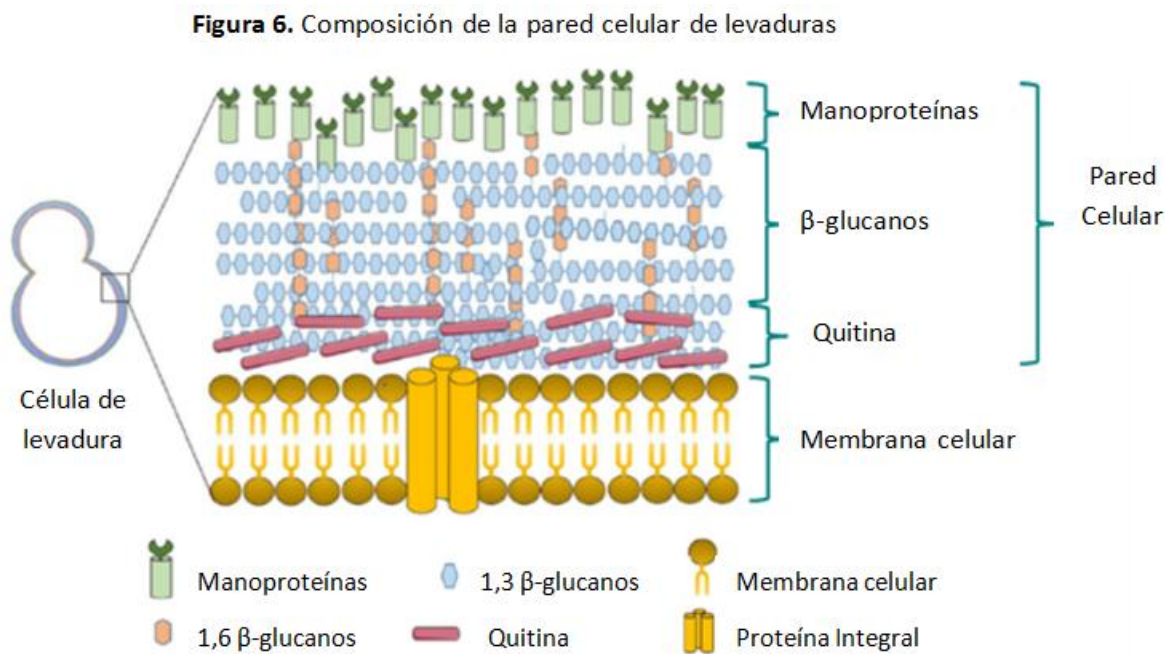
Además, los ensayos de migración se realizarán de tal modo de permitir el contacto de los materiales plásticos con los simulantes, *“en las condiciones de tiempo y temperatura que correspondan, de modo de reproducir las condiciones normales o previsibles de elaboración, fraccionamiento, almacenamiento, distribución, comercialización y consumo del alimento”* (C.A.A, cap. IV; res n° 32/10). Para dichos ensayos, se utilizarán cinco simulantes alimentarios diferentes que pretenden emular las características intrínsecas de las matrices alimentarias: A (simulante de alimentos acuosos no ácidos), B (simulante de alimentos acuosos ácidos), C (simulante de alimentos alcohólicos), D (simulante de alimentos grasos) y D´ (simulante equivalente al simulante D). Asimismo, las temperaturas y los tiempos de contacto son diversos y específicos para cada alimento en cuestión. En resumen, abarcan temperaturas entre los 5 - 150 °C, mientras que los tiempos de contacto son desde minutos hasta incluso días (C.A.A, cap. IV; res n° 32/10).

## 4.2.2. Pared celular de levadura

### 4.2.2.1. Composición

Las levaduras son hongos unicelulares, eucariotas, principalmente aerobios, que toleran un amplio rango de pH (3-10) y que ocupan una enorme variedad de nichos ecológicos tales como aire, mar, río, superficies de frutas y hojas, tejidos vegetales sanos y en descomposición, etc. (López Pérez y Boronat Gil, 2013; Aguilar, 2017). Tienen fundamentalmente la misma estructura celular que las células superiores de animales y vegetales, siendo la pared celular la primera línea de defensa que las protege de los ataques enzimáticos (Osumi, 1998).

La pared celular es un orgánulo que además de actuar como barrera separando a la célula del medio extracelular, proporciona principalmente estructura y forma a la misma. Representa entre un 20 a 30 % de la célula en peso seco y está compuesta de polisacáridos complejos de  $\beta$ -glucanos (58%), manoproteínas (40%) y quitina (2%) (% en peso seco de la pared celular) (Uscanga y col., 2005; Oliva y col., 2008; Aguilar-Uscanga y Francois, 2003). Químicamente y estructuralmente se basa en una capa interna interconectada de  $\beta$ -(1,3)-glucanos unida covalentemente con manoproteínas (en el extremo no reductor),  $\beta$ -(1,6)-glucanos y quitina, formando una matriz compleja macromolecular (**Figura 6**) (Peltzer y col., 2018 a).



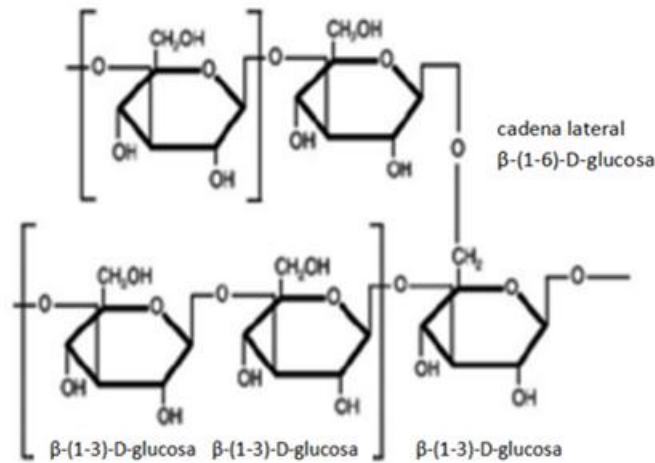
(Adaptado de Anwar y col., 2017)

Los  $\beta$ -glucanos son homopolisacáridos lineales de glucosa que están unidos (en levaduras) por enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) y cadenas laterales unidas por enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) (**Figura 7**) (Pizarro y col.,

2014). Hay tres clases de  $\beta$ -glucanos: 1)  $\beta$ -(1,3)-glucanos insolubles en álcali/ácido, que participan en el mantenimiento de la fuerza de la pared celular y forma; 2)  $\beta$ -(1,3)-glucanos solubles en álcali, que le confieren flexibilidad a la pared celular; 3)  $\beta$ -(1,6)-glucanos altamente ramificados, que actúan como interconector entre  $\beta$ -(1,3)-glucanos, manoproteínas y quitina (Peltzer y col., 2018 a).

Las manoproteínas son proteínas glicosiladas que contienen un 5-20% de porción peptídica y un 80-95% de cadenas del azúcar manosa. Se encuentran ubicadas en la capa externa de la pared celular ancladas a la capa interna de  $\beta$ -glucanos o bien atravesándola completamente (Lillo Reyes, 2016; Uscanga y col., 2005). Son las responsables de la porosidad de la pared, juegan un rol de filtro selectivo y protección contra los ataques químicos y enzimáticos de tipo glucanasa (Uscanga y col., 2005).

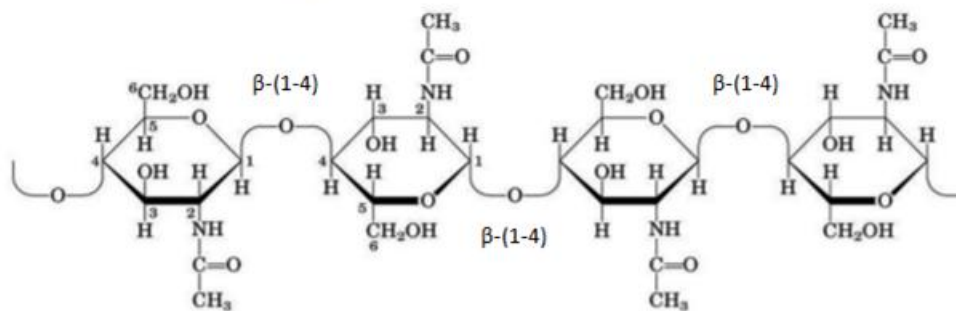
**Figura 7.** Unidades poliméricas de  $\beta$ -(1-3)-D-glucopiranosil con ramificaciones en  $\beta$ -(1-6)



(Adaptado de Pizarro y col., 2014)

La quitina (**Figura 8**) es un polisacárido estructural similar a la celulosa formada por unidades repetidas de N-acetilglucosamina (NAG) unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4). La configuración  $\beta$ -(1-4) del enlace provoca la estructura rígida y sin ramificaciones de estas moléculas (Moreno Villa, 2010). La abundancia en grupos acetoamidas en su constitución y su tendencia a formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares resultan en la formación de agregados lineales con un amplio grado de cristalinidad, lo cual refleja su fuerza e insolubilidad en agua (Moreno Villa, 2010).

**Figura 8.** Estructura de la quitina



(Fuente: Mármoly col., 2011)

#### 4.2.2.2. Métodos de obtención

En literatura existen diversas formas para extraer la pared celular de levadura debido a que el proceso general depende de múltiples variables que están sujetas a las distintas fases que componen al mismo, como la naturaleza del método, presión, temperatura, tiempo, tipo de levadura, etc. Sin embargo, todas coinciden en que se requiere de cuatro etapas fundamentales para la obtención de la misma: dispersión; ruptura celular; centrifugación y lavado.

##### 1) Dispersión

En esta primera etapa, se suspende la biomasa en medio alcalino (buffer fosfato 0,1 M a pH 8,5) o simplemente en agua destilada, con agitación, para formar la dispersión en cuestión (Nguyen y col., 1998; Rezzani y col., 2018; Valle y col., 2016; Northcote y Horne, 1952).

##### 2) Ruptura celular

Los métodos de ruptura celular son múltiples y pueden dividirse en dos grandes grupos; mecánicos y no mecánicos como se muestra en la **Figura 9**. Aunque existen grandes diferencias entre ambos, comparten una única finalidad; desestabilizar la célula para permitir la liberación de los componentes celulares al medio extracelular.

##### 3) Centrifugación

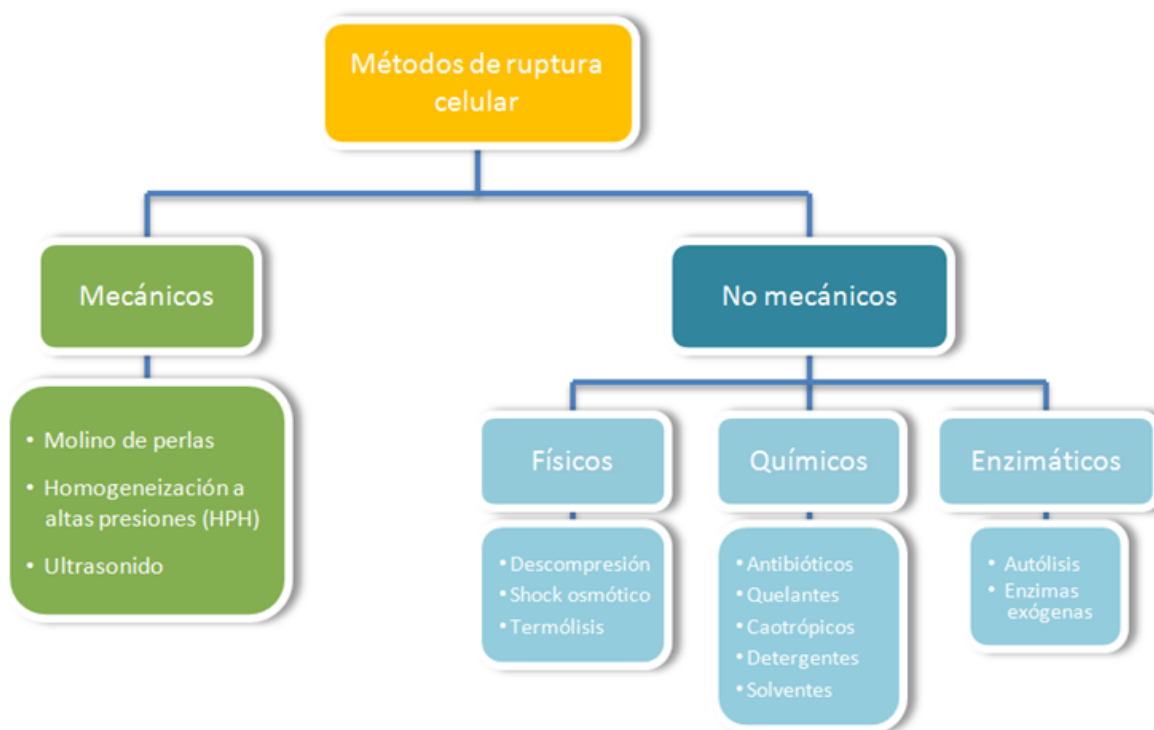
El producto obtenido por alguno de los métodos descritos anteriormente, se somete a centrifugación intensa (9000-12000 rpm, a 5 °C durante 15 a 20 min aproximadamente), proceso que utiliza la fuerza de gravedad para separar los diferentes componentes del mismo basándose en su tamaño, forma y densidad. Las partículas más pesadas que normalmente permanecían en suspensión, sedimentan. De este modo, la fracción insoluble/sedimento compuesto principalmente por pared celular, es recogida separándose del sobrenadante (Nieto, 2013; Nguyen y col., 1998, Rezzani y col., 2018).

#### 4) Lavado

Por último, se eliminan todo tipo de impurezas sometiendo dicha fracción a diversos y repetidos lavados con agua destilada (en las mismas condiciones de centrifugación previamente mencionadas) con el fin de alcanzar un rendimiento elevado (Nguyen y col., 1998, Rezzani y col., 2018).

Una vez finalizados estos tratamientos, se obtiene la biomasa de pared celular de levadura para su utilización como material base para la preparación de las películas biodegradables.

**Figura 9.** Métodos de ruptura celular



(Adaptado de Middelberg, 1995)

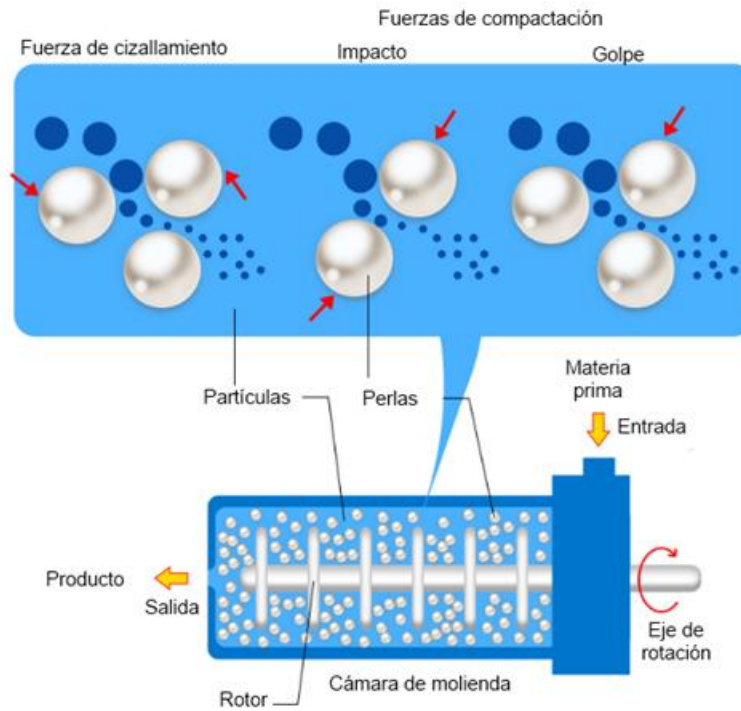
#### 4.2.2.2.1. Métodos mecánicos de ruptura celular

##### Molino de perlas

Consta en general de una cámara de molienda encamisada con un eje giratorio a través de su centro, equipado con agitadores de diseño variado (anillos o discos concéntricos) que imparten energía cinética a pequeñas perlas en la cámara, obligándolas a chocar entre sí como se muestra en la **Figura 10**. Las células se rompen en la zona de contacto con las mismas por acción de fuerzas de cizallamiento, compactación (impacto, golpe) y por la transferencia de energía desde las perlas

a las células. En consecuencia, la pared celular se destruye al apartar los componentes que le confieren resistencia (Middelberg, 1995; Liu y col., 2016).

**Figura 10.** Partes y funcionamiento de un molino de perlas horizontal



(Fuente: Ele, 2019)

### Homogeneización a altas presiones (HPH)

El diseño básico del homogeneizador (**Figura 11**) consiste en una bomba de desplazamiento positivo que fuerza a la dispersión de levaduras a circular radialmente a través del centro de una válvula de asiento, golpeando contra un anillo de impacto (presiones mayores a 60 MPa) (Liu y col., 2016; Delgado y col., 2018 a; Middelberg, 1995). Las células experimentan diversos efectos de cavitación, fuerzas de impacto y cizallamiento que permiten la liberación del material citoplasmático al medio extracelular producto de la lisis celular (Liu y col., 2016). El proceso continúa hasta que el 95% de las células se rompen, y puede observarse dicha ruptura mediante microscopía hasta lograr la estandarización del protocolo ensayado (Nguyen y col., 1998, Rezzani y col., 2018).

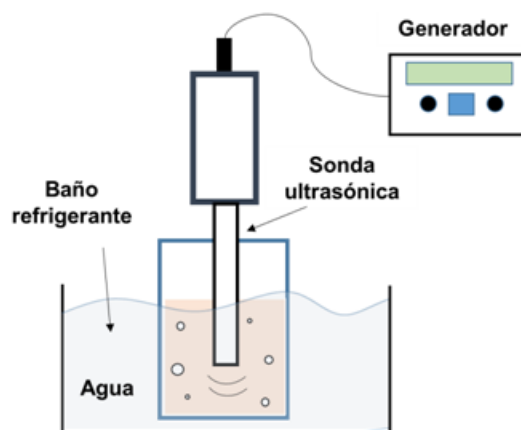
**Figura 11.** Homogeneizador HPH Panda



### Ultrasonido

Su fundamento se basa en la generación de ondas de alta frecuencia que inducen ciclos de alta y baja presión en el líquido. Las microburbujas creadas durante los ciclos de baja presión finalmente implosionan en ciclos de alta presión que producen ondas de choque locales (cavitación) equivalentes a miles de atmósferas, creando vibraciones acústicas, picos elevados de temperatura y termólisis del agua alrededor de las burbujas, formando radicales libres altamente reactivos (D'hondt y col., 2017; Liu y col., 2016). La ruptura celular se produce por el choque con dichas burbujas de alta energía (Sceni, 2021). En la **Figura 12** se muestra un diagrama del sonicador.

**Figura 12.** Diagrama del funcionamiento de un sonicador



(Fuente: Sceni, 2021)



#### 4.2.2.2.2. Métodos no mecánicos de ruptura celular

##### a) Físicos

###### *Descompresión*

En la descompresión explosiva, una suspensión celular se mezcla con gas subcrítico o supercrítico presurizado durante un tiempo definido. El gas entra en la célula y se expande al soltar la presión aplicada causando la ruptura de la misma a través de un mecanismo de sorción-desorción (Middelberg, 1995; Liu y col., 2016).

###### *“Shock” osmótico*

Las células se equilibran primeramente en un medio de alta presión osmótica (ej: sacarosa o sorbitol 1M) y luego se diluye repentinamente. El agua ingresa rápidamente al interior de la célula, incrementando la presión interna y provocando la lisis celular (Alvarez y col., 1994; Middelberg, 1995).

###### *Termólisis*

Consiste en aplicar temperaturas de tal modo de provocar la desnaturalización de las proteínas de la membrana celular, aumentando la fluidez e induciendo la pérdida de su integridad (Pillet y col., 2014; Ren y col., 2007).

##### b) Químicos

Los métodos químicos se basan en la interacción selectiva de las sustancias químicas (antibióticos, agentes quelantes y caotrópicos, detergentes, solventes, etc.) con los componentes de la pared o membrana celular, respondiendo a mecanismos de permeabilización que permiten que los componentes periplásmicos filtren a través del complejo manoproteico de la pared celular (Middelberg, 1995; Liu y col., 2016).

##### c) Enzimáticos

###### *Autólisis*

Consiste en la autodigestión de las células por escasez de ciertos nutrientes, principalmente compuestos nitrogenados e hidratos de carbono, o por inducción mediante tratamientos químicos o físicos (pH, solventes y shock térmico). La producción de enzimas líticas endógenas (glucanasas, proteasas, nucleasas y manasas) degradan la pared celular aumentando así su porosidad e induciendo la lisis celular (Sceni, 2021; Liu y col., 2016; Middelberg, 1995).

###### *Enzimas exógenas*

Consiste en el uso de enzimas hidrolíticas (glicosidasas, glucanasas, peptidasas y lipasas) que degradan al complejo de manoproteínas y a las cadenas de  $\beta$ -glucanos (Sceni, 2021).

### **4.2.3. Uso de pared celular de levadura como base de películas biodegradables**

Las levaduras han sido utilizadas a lo largo de la historia para elaborar diferentes alimentos como pan, vino y cerveza sin conocerse los fundamentos científicos hasta mediados del siglo XIX principios del siglo XX, donde el desarrollo tecnológico alcanzado permitió conocer en profundidad los mecanismos biológicos de multiplicación y crecimiento de las mismas (Suárez-Machín y col., 2016). Posteriormente, estudios permitieron expandir los conocimientos previamente adquiridos e innovar en la industria alimenticia a través de la elaboración de nuevos productos lanzados al mercado.

La denominación “levadura” es un nombre genérico que agrupa a una amplia variedad de organismos unicelulares que exhiben gran diversidad en relación a su forma, color y tamaño. (Suárez-Machín y col., 2016; Lagos Narváez, 2017). Sin embargo, cuando se nombra “levadura” es inevitable no remitirse a *Saccharomyces cerevisiae*, probablemente el microorganismo más ampliamente utilizado por el hombre a través del tiempo (Suárez-Machín y col., 2016).

Su uso más extendido como se ha mencionado con anterioridad, está enmarcado en la panificación y en las industrias de fabricación de cerveza, vino y alcohol. Sin embargo, existen numerosas aplicaciones como se resume en la **Tabla 16**. Entre ellas, una de las más novedosas es la elaboración de películas a partir de la pared celular de la misma, las cuales presentan propiedades mecánicas y de barrera prometedoras, además de la posibilidad de reemplazar las películas sintéticas por películas biodegradables aptas para el consumo humano (GRAS) (Delgado y col., 2016; Peltzer y col., 2018 b; Delgado y col., 2018 a; Peltzer y col., 2018 a; Suárez-Machín y col., 2016).

Asimismo, los  $\beta$ -glucanos (constituyentes de la pared celular de levadura) presentan capacidad para formar películas y propiedades biodegradables que los hacen muy interesantes en el área de los materiales destinados a estar en contacto con alimentos (Peltzer y col., 2018 a). Sin embargo, el desarrollo de películas a base de dichos componentes está sujeto continuamente a investigación debido a su reciente revelación y no menos importante, a su elevado costo de extracción y purificación (Freimund y col., 2003; Hejlova y Blahovec, 2015). A pesar de ello, se han publicado estudios que evaluaron las características y las propiedades mecánicas de las mismas, con la finalidad de conocer con mayor detalle cómo se comportan y en consecuencia, sus potenciales usos en alimentos (Novák y col., 2012; Blahovec y col., 2011; Peltzer y col., 2018 a). Otro componente muy importante en la composición de la pared celular de levaduras son las manoproteínas, compuestas principalmente por cadenas de manosa. Aunque no presentan capacidad para formar películas como tal, podrían participar en la formación de las mismas como agentes plastificantes. En efecto, Zhang y Han (2010) compararon las características de películas a base de almidón con diferentes agentes plastificantes, entre ellos, manosa. Dichos autores señalaron que las películas a base de almidón formuladas con manosa al 10%, exhibieron los valores más altos en módulo de Young y más bajos en elongación.

**Tabla 16.** Usos y propiedades de la célula de levadura *S. cerevisiae* y sus componentes

Aplicaciones	Referencias
Ingrediente en la alimentación de animales (mejora la palatabilidad y la conversión alimenticia)	Leimer y Finguerut, 2005
Ingrediente en productos dietéticos para consumo humano (fuente importante de vitamina B, minerales, proteínas y ácidos nucleicos)	Otero y col., 2011; Leimer y Finguerut, 2005
Agente espesante y estabilizante de emulsiones	Thammakiti y col., 2004; Xiu y col., 2011; Sceni y col., 2009
Agente higroscópico y aglutinante (aceites)	Moran, 2004
Agente gelificante, coagulante y texturizante	Otero y col., 2011
Sustituto de grasas en formulaciones alimentarias	Worrasinchai y col., 2006
Ingrediente en la producción de chocolate	Parapouli y col., 2020
Capacidad formadora de películas	Otero y col., 2011; Peltzer y col., 2018 a
Agente cicatrizante/tratamiento cutáneo/aplicación tópica	Davis y Perez, 2009; Chan y col., 2009
Agente inmunoestimulante	Rodrigues y col., 1996; Šandula y col., 1999
Agente anticancerígeno	Moran, 2004
Adsorbente de micotoxinas	El-Naggar y Thabit, 2014; Moran, 2004
Probiótico	Pooramini y col., 2009; Ghosh y col., 2012
Producción de bioetanol	Parapouli y col., 2020

#### 4.2.3.1. Características de las películas de pared celular

Pese a que la composición de las películas es muy simple y requiere de pocos elementos para su formulación, las múltiples diferencias que existen entre ellas nos describen su inmensa complejidad. Efectivamente, existen numerosas características que presentan las mismas y que pueden ser evaluadas bajo diferentes aspectos, dentro de los cuales se buscan principalmente películas con buenas propiedades mecánicas y que actúen como barrera selectiva frente al transporte de gases, vapores y solutos (Peltzer y col., 2018 a).

Rezzani (2018) elaboró películas de pared celular de levadura (PPCL) (con el agregado de un extracto antioxidante como compuesto activo) obtenidas a partir de métodos de ruptura diferentes: homogeneización e hidrólisis enzimática. En el primer caso, la pared celular se obtuvo a partir de una dispersión de levaduras seguida de homogeneización, centrifugación y sucesivos lavados. En el segundo caso, se preparó una disolución de levaduras sometida a hidrólisis enzimática a 60 °C durante 24 horas y agitación (120 rpm) mediante la adición de papaína. El análisis termo-gravimétrico (TGA) mostró picos de temperaturas máximas de 319 °C y 304 °C en películas obtenidas por homogeneización e hidrólisis enzimática respectivamente, correspondiente a la degradación de  $\beta$ -glucanos y proteínas. El estudio de las propiedades mecánicas mostró que las películas obtenidas por homogeneización presentaron una mayor resistencia a la tracción y deformación a la ruptura, respecto a las obtenidas por hidrólisis

enzimática. Ambas películas mostraron permeabilidades al vapor de agua ( $P_w^{exp}$ ) del orden de  $10^{-10}$  g/m.s.Pa comparables a la mayoría de las películas biopoliméricas. Las isothermas de sorción mostraron el mismo comportamiento para ambos tipos de películas, revelando que la hidratación de las mismas se da en forma de multicapas.

Otros estudios elaboraron PPCL con diferentes concentraciones de glicerol como agente plastificante (Peltzer y col., 2018 b). Las películas obtenidas fueron translúcidas, de color amarillo-amarronado, homogéneas, maleables (en general) y sin grietas. Los resultados señalaron que las mismas presentan propiedades mecánicas satisfactorias (dada por una matriz multicomponente de polisacáridos y proteínas) cuando sus respectivos valores de tensión y módulo de Young fueron comparados con películas a base de proteínas y polisacáridos, no plastificadas y plastificadas con glicerol. No obstante, la mayor diferencia de las mismas respecto a películas confeccionadas con otras matrices se observó en las propiedades de elongación, donde las PPCL alcanzaron niveles entre 5-30% según su plastificación, considerablemente menores a 116% y 219% en películas a base de proteínas de gluten y arveja respectivamente (Jost y Stramm, 2016). Los autores atribuyeron estas diferencias al proceso de elaboración, en la que se mantuvo la forma de la pared celular y la estructura de la matriz. Asimismo, demostraron que las PPCL se degradan sustancialmente a temperaturas mayores a 180 °C, comenzando con la pirólisis de  $\beta$ -glucanos y degradación de proteínas y terminando con la descomposición de polisacáridos y otros restos de materia orgánica. Con respecto a los estudios de permeabilidad, las PPCL presentaron valores similares de  $P_w^{exp}$  en comparación a películas obtenidas con otras fuentes, como películas a base de proteína de arveja (Jost y Stramm, 2016). El uso de glicerol puede modificar considerablemente dicho parámetro, ya que el mismo tiende a introducir más agua en la matriz debido a su carácter higroscópico. En efecto, el aumento en la concentración de glicerol en la formulación de PPCL provocó un aumento en la  $P_w^{exp}$ . La solubilidad de las películas en agua fueron bajas (15-35%) con respecto a películas a base de gelatina (100%) y almidón de trigo (75%) (Tanada-Palmu y Grosso, 2003). Por último, se llevaron a cabo estudios de isothermas de sorción, mostrando ser similares a películas reportadas en literatura a base de almidón, celulosa, hidroximetilcelulosa, proteínas miofibrilares y caseinatos de sodio. Los constituyentes de la pared celular de levadura mostraron a su vez capacidad para formar películas. De hecho, Novák y col. (2012) elaboraron películas a base de  $\beta$ -glucanos. Los  $\beta$ -glucanos fueron aislados a partir de la digestión alcalina con hidróxido de sodio, seguida por centrifugación separando los residuos de la pared celular. Las propiedades mecánicas evaluadas como módulo de Young, resistencia a la tracción y deformación en el punto de ruptura, alcanzaron valores de  $712 \pm 31$  MPa,  $17,48 \pm 0,61$  MPa y  $14,16 \pm 1,11$  MPa respectivamente. Por otro parte, las películas de  $\beta$ -glucanos mostraron ser insolubles en agua, compactas y no porosas, además de no exhibir cristalinidad.

#### **4.2.3.2. Antecedentes de aplicaciones en alimentos**

En las últimas décadas se ha manifestado un aumento en el interés del desarrollo de nuevos materiales y revestimientos biodegradables basados en compuestos de origen natural como proteínas, lípidos y polisacáridos (Peltzer y col., 2018 a). Las múltiples ventajas y beneficios que implican el uso de los mismos generan enorme curiosidad en el ámbito científico, en especial

en el área de los alimentos, debido a que pueden servir como recubrimientos en los productos alimenticios (Krochta, 2017; Hassan y col., 2018; Peltzer y col. 2018 b).

Como se ha mencionado anteriormente, las películas a base de pared celular de levaduras presentan características satisfactorias cuando se las compara con películas convencionales. Sin embargo, la información en literatura acerca del uso de las mismas en alimentos es limitada debido a que es una temática novedosa sujeta a investigación (Delgado y col., 2018, Choque y col. 2021).

La elaboración de microcápsulas a base de células de *S. cerevisiae* es uno de los ejemplos de aplicación en alimentos más recientes, debido a las múltiples ventajas que conlleva el uso de nanomateriales como el tamaño, alta relación superficie-volumen y propiedades ópticas únicas. Las células de *S. cerevisiae* están disponibles en grandes cantidades, tienen un color claro, sabor suave, haciendo de todas estas características un medio interesante para encapsular y proteger compuestos bioactivos (Peltzer y col., 2018 a).

Las células “vacías” de levadura son sistemas termoestables muy interesantes que pueden actuar como agentes encapsulantes. Dardelle y col. (2007) utilizaron dichas células para atrapar y retener aceites saborizantes, las cuales fueron probadas en la cocción de fideos. Dichos autores señalaron que la afinidad entre las moléculas (que les conferían sabor) y la bicapa fosfolipídica hidrofóbica (membrana plasmática) eran las responsables de la capacidad encapsulante de las levaduras. A su vez, indicaron que la liberación de las moléculas hacia el medio externo dependía de la hidrofobicidad de las mismas. Por último, demostraron que las células resistieron al período de cocción y que los aceites saborizantes todavía permanecían en el interior de las mismas luego del proceso. Otros estudios utilizaron las células de levadura para encapsular aceites esenciales de cáscara de naranja con el objetivo de estudiar la posible capacidad de la bicapa de las células de levaduras de actuar como liposomas, permitiendo la estabilización de los aceites encapsulados proporcionando productos estables (Bishop y col., 1998). Por otro lado, Paramera y col. (2011) elaboraron microcápsulas incorporadas con curcumina. Dichos autores demostraron no sólo que la curcumina permanecía integrada en la membrana plasmática de las células de levadura, sino que a su vez podía interactuar con los componentes de la pared celular como glucanos y manoproteínas.

### **4.3. Incorporación de HL como compuesto activo en películas biodegradables**

#### **4.3.1. Envases activos**

En las últimas décadas los consumidores se han ido interesando cada vez más en los alimentos que compran, orientando su búsqueda hacia productos mínimamente procesados, naturales, frescos y saludables, exigiendo calidad, seguridad e información acerca de los mismos. Las industrias, en el intento por cumplir y responder a dichas preferencias, se ajustan a las tendencias propias de la globalización del mercado desarrollando nuevas tecnologías en los procesos de producción, elaboración y envasado (Álvarez, 2000; Cañón y col., 2017). Actualmente el envasado, además de cumplir con sus funciones básicas como contención del alimento y actuar como barrera pasiva separando el producto del medio ambiente, etc., se está transformando en una barrera activa a través de la cual ocurren interacciones con el contenido, y puede ser el mediador entre el alimento y el consumidor final al brindarle información, seguridad y calidad al producto que va a adquirir (Catalá, 2010; Rodríguez-Sauceda y col., 2014). De este modo es que nace una de las innovaciones más interesantes en el campo de los envases; los “envases activos”.

Un envase activo puede definirse como un sistema que interactúa positivamente con el alimento y su entorno en beneficio de la mejora de su calidad, aceptabilidad y seguridad, alargando su vida útil (Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011; Álvarez, 2000; Cañón y col., 2017). Esta interacción implica en general una transferencia de masa, bien para agregar sustancias al contenido del envase (alimento) o bien para absorber componentes del mismo (Cañón y col., 2017).

El compuesto activo que participa en dicha interacción puede formar parte del propio material del envase (sistemas integrados) o ser algún material ajeno al envase incluido en él (sistemas independientes) (Álvarez, 2000; Cañón y col., 2017). En el primer caso, las sustancias activas pueden ser incorporadas a las películas del envase que estén o no en contacto con el alimento (Cañón y col., 2017; Álvarez, 2000). La ventaja de éste radica en que el contacto de la sustancia se produce en toda la superficie expuesta del alimento y no como en el caso de los sistemas independientes con un área restringida (Álvarez, 2000). Además, dicho sistema activo no es percibido por el consumidor como un elemento diferenciado del envase, lo que evita el posible rechazo por parte de los mismos y el riesgo de consumo accidental de su contenido (Cañón y col., 2017). Las películas desarrolladas en el presente trabajo pertenecen al tipo de sistemas integrados, en las que el HL actúa como sustancia activa.

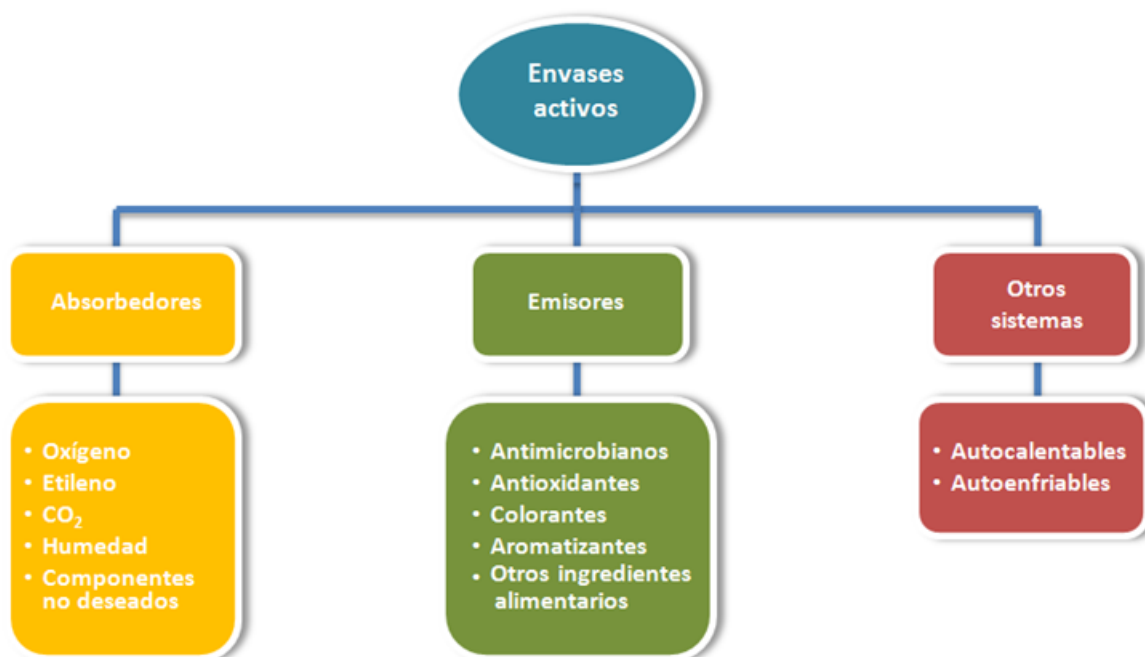
En los sistemas independientes, el método básico consiste en la utilización de “saquitos” de material permeable (por una sola cara) orientada hacia la atmósfera del envase donde se produce la transferencia de materia a través del mismo. Deben ir acompañados de una etiqueta que informe al consumidor que es una parte no comestible y así evitar su consumo accidental (Álvarez, 2000; Cañón y col., 2017). Es necesario señalar que lo anteriormente mencionado no debe ser confundido con otro concepto frecuentemente utilizado en el ámbito de los materiales, como lo son los envases inteligentes. Éstos aportan información sobre la calidad del producto o el estado del envase al monitorizar y poner en evidencia física los cambios que se producen en el

mismo durante la cadena de suministro (Rodríguez-Sauceda y col., 2014; Cañón y col., 2017). En pocas palabras, mientras que el envase inteligente es capaz de suministrar y registrar información relativa del estado del envase y/o producto, el envase activo es capaz de interactuar con el alimento o entorno para mejorar la seguridad y su calidad (Rodríguez-Sauceda y col., 2014).

#### 4.3.1.1. Tipos de envases activos

Existen diversas alternativas para mejorar y alargar la vida útil de los alimentos, combatiendo las principales problemáticas que alteran las propiedades de los mismos. Las variables externas como el agua, los gases (oxígeno, dióxido de carbono, etileno, etc.) y los microorganismos son los principales factores que se abordan como estrategias en el envasado. Dentro de éstos, los envases activos se pueden clasificar en tres grandes grupos (**Figura 13**): a) Absorbedores/Eliminadores; b) Emisores/Liberadores y c) Otros sistemas.

**Figura 13.** Tipos de envases activos según su función



##### 4.3.1.1.1. Absorbedores/Eliminadores

Son aquellos que absorben sustancias químicas removiendo los gases o compuestos indeseables de los envases, tales como oxígeno, dióxido de carbono, etileno y humedad, con el fin de alcanzar una atmósfera interna favorable (Álvarez, 2000; Cañón y col., 2017; Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011). Los principios implicados en su control son numerosos y pueden abarcar

fenómenos de absorción, adsorción/desorción, reacciones de oxidación, catálisis enzimática, etc. (Álvarez, 2000).

*a) Absorbedores de oxígeno*

Reducen y controlan de manera activa los niveles residuales de oxígeno en el interior del envase, ralentizando los fenómenos de oxidación (enranciamiento de grasas/aceites, pérdida de nutrientes sensibles al oxígeno, pérdida/cambio de color, reacciones de pardeamiento, etc.), crecimiento de microorganismos y mohos, infestación por insectos, entre otros (Fabra, 2020; Ozdemir y Floros, 2004; Cañón y col., 2017; Álvarez, 2000; Catalá, 2010). Estos efectos pueden alcanzarse mediante el uso de sustratos oxidables como; hierro y sales ferrosas (Fabra, 2020; Álvarez, 2000; Cañón y col., 2017; Díaz, 2014; Ozdemir y Floros, 2004), sustancias orgánicas como ácido ascórbico, catecol, ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico, linolénico), colorantes fotosensibles, polímeros modificados (Díaz, 2014; Cañón y col., 2017; Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011) y enzimas como las oxidorreductasas (Álvarez, 2000).

*b) Absorbedores de etileno*

El etileno es una sustancia procedente de la combustión de los hidrocarburos, de la actividad de los tejidos vegetales y de distintos microorganismos. La presencia de esta fitohormona en frutas y verduras reduce la vida útil de las mismas y por eso se buscan alternativas para evitar el deterioro de ellas (Gaikwad y col., 2020; Díaz, 2014; Álvarez, 2000; Cañón y col., 2017). Las sustancias más utilizadas son permanganato de potasio, que se dispone sobre sustratos adecuados (alúmina, sílica gel, etc.) para favorecer el proceso redox (oxidando el etileno hasta dióxido de carbono y agua) y minerales finamente divididos y dispersados (zeolitas, cristobalita, sepiolita, silicatos, carbón activado, etc.) (Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011; Díaz, 2014; Cañón y col., 2017; Álvarez, 2000; Catalá, 2010; Ozdemir y Floros, 2004).

*c) Absorbedores/reguladores de humedad*

Niveles elevados de agua en el interior del envase promueven el crecimiento de microorganismos, ablandamiento de productos secos y crujientes (galletas, bizcochos, pastas), apelmazamiento y endurecimiento en café liofilizado y leche en polvo, entre otros, reduciendo considerablemente la vida útil de los alimentos. La utilización de agentes altamente higroscópicos y deshidratantes permiten la absorción de humedad eliminando el exceso de agua líquida o controlando el vapor de agua en el espacio superior del envase (Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011; Díaz, 2014; Cañón y col., 2017). Debido a ello, desde el punto de vista comercial se los puede clasificar en; i) absorbedores de agua líquida, los cuales utilizan almohadillas u hojas de materiales poliméricos normalmente porosos conteniendo agentes higroscópicos (celulosa, propilenglicol, carbohidratos, etc.) para absorber líquidos de exudación, mejorando la presentación del producto y evitando el crecimiento de microorganismos (Cañón y col., 2017; Ozdemir y Floros, 2004). Asimismo, se pueden emplear agentes “antivaho”, sustancias anfifílicas (del tipo etoxilatos no iónicos o monoglicéridos) que migran hacia la superficie del envase reduciendo la tensión



superficial entre el agua condensada y el material plástico, formando una película continua, fina y transparente que permite ver el contenido interior (Álvarez, 2000; Catalá, 2010); ii) reguladores de la humedad relativa, los cuales utilizan “saquitos”/sobres o etiquetas que contienen agentes deshidratantes tales como sílicagel, óxido de calcio, cloruro de sodio, etc., para controlar el crecimiento microbiano en productos frescos y para evitar la rehidratación parcial en productos deshidratados (Álvarez, 2000; Cañón y col., 2017; Ozdemir y Floros, 2004).

#### d) Absorbedores de dióxido de carbono

La principal finalidad consiste en mantener la integridad y el aspecto de los envases que pueden dañarse por la sobrepresión que origina el dióxido de carbono que se libera, por ejemplo, en el tostado de los granos de café. Para su absorción/eliminación del espacio superior del envase, se utiliza óxido de calcio, carbonato de sodio, hidróxido de calcio, etc., con algún agente higroscópico (Álvarez, 2000; Ozdemir y Floros, 2004; Cañón y col., 2017; Díaz, 2014).

#### 4.3.1.1.2. Emisores/Liberadores

Son aquellos que liberan sustancias químicas al interior del envase con el propósito de proteger y mejorar la calidad del producto (Cañón y col., 2017; Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011). Esto implica la transferencia de masa desde el sistema o material activo al contenido del envase. Las sustancias utilizadas comprenden desde antioxidantes, agentes antimicrobianos (etanol, dióxido de carbono, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido propiónico, bacteriocinas, etc.) hasta saborizantes, aromatizantes, colorantes, entre otros (Díaz, 2014; Cañón y col., 2017). Este sería el caso del sistema que se pretende desarrollar mediante la incorporación de HL como compuesto activo en películas biodegradables. El HL pertenecería a esta categoría debido a que presenta en su composición compuestos con capacidad antimicrobiana y antioxidante como se ha descrito con anterioridad.

#### a) Emisores de agentes antimicrobianos

El crecimiento de microorganismos es la principal causa del deterioro de los alimentos y la misma puede retardarse mediante la adición de agentes antimicrobianos tales como etanol, dióxido de carbono, bacteriocinas, antibióticos, ácidos orgánicos, polisacáridos, aceites esenciales, extractos de especias, etc. (Catalá, 2010; Cañón y col., 2017). Algunos ejemplos son: i) liberadores de etanol, los cuales consisten en saquitos que contienen etanol absorbido o encapsulado, a partir del cual se libera el mismo en forma de vapor (en respuesta a la absorción de vapor de agua) al espacio exterior/superior del envase (Díaz, 2014; Cañón y col., 2017; Álvarez, 2000), ii) liberadores de dióxido de carbono, entre los cuales los de mayor aplicación son el carbonato ferroso (reacción de hidrólisis), carbonato de sodio y carbonato ácido de sodio (reacción con ácidos orgánicos) y ácido ascórbico (oxidación) (Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011; Cañón y col., 2017), iii) liberadores de extractos naturales, tales como aceites esenciales (de orégano, canela, clavo), extractos de plantas (semillas de uva, romero, orégano, etc.) y componentes obtenidos de los mismos como alil-isotiocianato y propóleo (Cañón y col., 2017; Sharma y col., 2020).

#### **b) Emisores de agentes antioxidantes**

Los procesos de oxidación son otra de las causas que alteran las propiedades y las características intrínsecas de los alimentos, reduciendo significativamente la vida útil de los mismos. Para evitar y retardar dicho proceso, se emplean principalmente compuestos sintéticos como BHA, BHT y Terbutilhidroquinona (TBHQ), y compuestos naturales como vitamina E y extractos naturales ricos en fenoles y/o terpenos debido a la demanda de los consumidores por reducir los niveles de uso de aditivos sintéticos (Cañón y col., 2017; Díaz, 2014; De Abreu y col., 2010; Prasad y Kochhar, 2014). Los aceites esenciales también se utilizan como agentes antioxidantes en materiales activos (Sharma y col., 2020).

#### **c) Liberadores de otros ingredientes alimentarios**

Los consumidores no sólo exigen calidad y seguridad, sino también reclaman innovación e inclusión de nuevas tecnologías en los alimentos. La incorporación de aromatizantes en el envase permite realzar el aroma del alimento al descubrir su contenido y mejorar el aroma propio del producto fresco. A su vez, se aplican diversas sustancias activas integradas en los materiales desde donde se liberan mediante difusión al propio alimento o al espacio superior del mismo (Prasad y Kochhar, 2014; Cañón y col., 2017; Gutierrez y col., 2009).

#### **4.3.1.1.3. Otros sistemas**

En éstos se incluyen principalmente los reguladores de temperatura, que tienen como finalidad auto calentar/enfriar los alimentos (Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011). Los tiempos de hoy en día fuerzan a que las actividades normales de la vida cotidiana se realicen con mayor rapidez, facilidad y comodidad. Estos envases activos apuntan a dichas exigencias, logrando que la comida/bebida alcance una temperatura agradable y que perdure durante un tiempo suficiente al ser consumidas. La técnica para el desarrollo de los mismos consiste en procesos exotérmicos/endotérmicos donde el producto que va a calentarse/enfriarse está conectado con un recipiente dividido en una doble cámara. Una de las cámaras contiene agua y la otra, una sustancia que al entrar en contacto con éste último, desencadenan las reacciones anteriormente mencionadas cumpliendo de éste modo con dicha finalidad. Las sustancias que se incorporan al agua en el caso de los alimentos autocalentables y autoenfriables son básicamente el óxido de calcio y magnesio, y el nitrato y nitrito de amonio, respectivamente (Díaz, 2014; Cañón y col., 2017; Hernández y col., 2014; Day, 2003; Bodbodak y Rafiee, 2016; Mane, 2016).

#### **4.3.1.2. Legislación**

Los envases activos e inteligentes exhiben una amplia gama de respuestas frente a las exigencias que presenta el mercado actual en el envasado de los alimentos a nivel mundial como se ha mencionado con anterioridad. Estos conocimientos ya están siendo empleados en distintas partes del mundo como Estados Unidos, Japón y Australia (Cañón y col., 2017; Díaz, 2014). Sin embargo, no existe en literatura información relacionada a los mismos en América del Sur y su

aplicación en Europa todavía es limitada, tal vez por la falta de información o conocimiento acerca de la demanda de estos productos por parte de los consumidores, de la eficacia de los mismos o del impacto económico o ambiental que puedan presentar (Cañón y col., 2017).

Si bien no existe a nivel nacional una regulación acerca de los envases activos como se ha mencionado anteriormente, el compuesto activo que forma parte de éstos, al entrar en contacto con el alimento y migrar hacia éste, se vuelve un ingrediente y debe ser tratado como tal.

El capítulo XVIII del C.A.A (aditivos alimentarios) define al ingrediente como *“toda sustancia, incluidos los aditivos alimentarios, que se emplee en la fabricación o preparación de alimentos y que esté presente en el producto final en su forma original o modificada”*. Asimismo, los aditivos alimentarios son *“cualquier ingrediente agregado a los alimentos intencionalmente, sin el propósito de nutrir, con el objeto de modificar las características físicas, químicas, biológicas o sensoriales”* de los mismos (C.A.A, cap. V; res n° 26/03).

Estos mismos deben estar en la lista de ingredientes siempre y cuando la concentración sea *“significativa o suficiente para ejercer una función tecnológica en ese alimento”* (C.A.A, cap. XVIII; res n° 105/94). De lo contrario, estarán exentos de la declaración en la lista de ingredientes cuando se cumplan las siguientes condiciones (tratadas en la misma resolución anteriormente mencionada):

- *“La cantidad del aditivo en las materias primas u otros ingredientes no exceda a la cantidad máxima permitida en el alimento”*.
- *“El alimento al cual el aditivo es transferido, no contenga dicho aditivo en cantidad mayor que la que podría ser introducida por el uso de los ingredientes”*.
- *“El aditivo transferido se encuentre presente en un nivel no funcional o sea a un nivel significativamente menor que el normalmente requerido para lograr una función tecnológica eficiente en el alimento”*.

En el presente trabajo, el HL incorporado en películas biodegradables a base de pared celular de levadura, tiene como principal objetivo ejercer una función tecnológica al entrar en contacto con el alimento, actuando como agente antimicrobiano y antioxidante. Debido a ello, éste último debe ser tratado como un ingrediente y en consecuencia debe estar en la lista de estos mismos.

Por el contrario, la Comisión Europea (CE) incluye el concepto de envases activos (e inteligentes) en su reglamento (CE, n° 1935/2004) definiéndolos como *“materiales y objetos destinados a ampliar el tiempo de conservación, o a mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados, y que están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmitan sustancias a los alimentos envasados o al entorno de éstos o que absorban sustancias de los alimentos envasados o del entorno de éstos”*.

La normativa europea indica especificaciones acerca del etiquetado de los mismos con el fin de proporcionar información adecuada, precisa y suficiente a los consumidores, evitando

posibles equivocaciones, además de requisitos respecto a la calidad del alimento en contacto con el compuesto activo. Dichas especificaciones son mencionadas a continuación:

- *“Hay que facilitar a los usuarios un etiquetado y una información adecuados que les ayuden a utilizar de manera segura y correcta los materiales y objetos activos en cumplimiento de la legislación alimentaria”.*
- *“Los materiales y objetos activos no deben dar una información sobre el estado de los alimentos que pueda inducir a error a los consumidores”.*
- *“Los materiales y objetos activos no ocasionarán modificaciones de la composición ni de las características organolépticas de los alimentos, por ejemplo enmascarando su deterioro, que puedan inducir a error a los consumidores”.*
- *“Los materiales y objetos activos estarán convenientemente etiquetados para indicar que dichos materiales y objetos son activos”.*
- *“Los materiales y objetos activos e inteligentes que estén ya en contacto con alimentos deberán llevar el etiquetado adecuado que permita al consumidor identificar las partes no comestibles”.*

En referencia a éste último, se introdujeron algunas normas adicionales en el reglamento (CE) n° 450/2009 con la finalidad que el consumidor pueda distinguir las partes no comestibles de las comestibles, debiendo ser etiquetadas de la siguiente manera:

- a) con las palabras «NO INGERIR» y,
- b) siempre que sea técnicamente posible, figurará en ellos el símbolo reproducido en el anexo I (Figura 14).

**Figura 14.** Símbolo que representa las partes no comestibles



La información exigida en a) y b) *“deberá ser visible, claramente legible e indeleble y deberá imprimirse en caracteres con un tamaño mínimo de carácter de 3 mm”.*

Además, en dicho reglamento (n° 450/2009) se indica los tipos de materiales que pueden utilizarse en la elaboración de los envases activos (como *“plástico, papel y cartón, o*

revestimientos y barnices”) y la disposición de las sustancias activas en dichos materiales, presentándose “en un recipiente aparte, por ejemplo en una bolsita de papel, o estar directamente incorporadas en el material de envase, por ejemplo en el plástico de una botella hecha de ese material”.

Dichas “sustancias activas liberadas” son aquellas “a ser liberadas en el alimento envasado, en su superficie o en su entorno por materiales y objetos activos liberadores y que cumplen un propósito en el alimento”. Las mismas podrán utilizarse sin que estén incluidas en la lista comunitaria de sustancias autorizadas siempre y cuando cumplan con las condiciones expuestas en el artículo 9:

- “Las sustancias activas liberadas y las sustancias añadidas o incorporadas mediante implantación o inmovilización, para tener un efecto tecnológico en el alimento, deberán utilizarse cumpliendo plenamente las disposiciones comunitarias y nacionales pertinentes aplicables a los alimentos y cumplir las disposiciones del Reglamento (CE) n° 1935/2004 y, en su caso, sus medidas de desarrollo”.
- “La cantidad de sustancia activa liberada no se incluirá en el valor de la migración global medida en los casos en que en una medida comunitaria específica se establezca un límite de migración global para el material en contacto con alimentos al que se incorpore el componente”.
- “La cantidad de sustancia activa liberada podrá superar la restricción concreta establecida para esa sustancia en una medida comunitaria o nacional específica sobre los materiales en contacto con alimentos a los que se incorpore el componente en tanto en cuanto cumpla las disposiciones comunitarias o, en su defecto, nacionales aplicables a los alimentos”.

#### **4.3.2. Liberación de los compuestos activos en alimentos o simulantes alimentarios**

##### **4.3.2.1. Ensayos de migración de los compuestos activos en simulantes alimentarios**

La efectividad de los envases activos se evalúa a través de ensayos de liberación controlada del compuesto activo en el alimento. Para esto, se realizan ensayos de migración en simulantes alimentarios a partir de los cuales se estudia cómo se libera el compuesto activo desde el material de envase hacia el producto (alimento/simulante), qué cantidad se libera y con qué velocidad lo hace.

La migración de aditivos desde los materiales del envase en contacto con el alimento hacia el producto alimenticio ha recibido un gran interés desde principios de la década de los 80’s. Estudios toxicológicos en roedores y humanos sobre el uso de plastificantes en la industria del envase demostraron que los mismos eran capaces de generar graves daños en los organismos a través de la migración de sus constituyentes al alimento (Anbinder, 2011). Debido a ello, las

autoridades responsables en la materia han reconocido la importancia en la regulación de dichos aspectos adoptando diversas medidas para su control (Lau y Wong, 2000).

El C.A.A define la migración como “*la transferencia de componentes desde el material en contacto con los alimentos hacia dichos productos, debido a fenómenos fisicoquímicos*”. La misma ocurre mediante un proceso submicroscópico (como consecuencia de la tendencia al equilibrio de todo sistema químico) que depende de múltiples factores tales como temperatura, tamaño molecular de las especias migrantes, estructura química y polaridad de los componentes, naturaleza del polímero (densidad, grado de cristalinidad, etc.), área superficial de contacto, entre otros (Estacho, 2013; Katan, 1996; Anbinder, 2011; Barnes y col., 2006). La complejidad del proceso se traduce en la dificultad de establecer un patrón general en la determinación de la misma en las diversas matrices alimentarias. Sin embargo, para su análisis se utilizan simulantes que reflejan las características físico-químicas principales imitando el comportamiento de los alimentos.

Los simulantes alimentarios para los ensayos de migración de envases y equipamientos plásticos en contacto con los alimentos son clasificados por el C.A.A de la siguiente manera:

- Simulante A (simulante de alimentos acuosos no ácidos;  $pH > 4.5$ ): agua destilada.
- Simulante B (simulante de alimentos acuosos ácidos;  $pH \leq 4.5$ ): solución de ácido acético al 3% (m/v) en agua destilada.
- Simulante C (simulante de alimentos alcohólicos): solución de etanol al 10% (v/v) en agua destilada o solución de etanol en agua destilada a la concentración más próxima a la real.
- Simulante D (simulante de alimentos grasos): solución de etanol al 95% (v/v) en agua destilada o desionizada, o isooctano, o MPPO (óxido de polifenileno modificado), según corresponda.
- Simulante D' (simulante equivalente al simulante D): aceites comestibles (aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de maíz) o mezclas sintéticas de triglicéridos.

La liberación de los componentes activos de las películas puede seguirse determinando la migración específica del polímero en los diferentes simulantes alimentarios anteriormente mencionados (López de Dicastillo y col., 2011). En la resolución n° 40/15 del C.A.A se especifican las condiciones de temperatura y tiempos de contacto para cada uno de los simulantes.

Para la realización del ensayo (inmersión total en ambas caras), se sumergen las películas a ensayar en el simulante manteniendo una relación área-volumen de  $6 \text{ dm}^2/\text{L}$  (película/simulante). Transcurrido el tiempo de incubación, se toma una alícuota de simulante y se analiza cuantitativamente el compuesto migrado/liberado. Asimismo, es posible tomar periódicamente una alícuota del simulante a distintos tiempos de forma tal de obtener una cinética de liberación (López de Dicastillo y col., 2011). La concentración del compuesto activo liberado al simulante se mide analíticamente a través de métodos adecuados que serán mencionados en la sección 4.3.2.2. Como blanco de cada ensayo se utiliza el medio simulante específico para los mismos y como control, una película sin aditar. Para los ensayos de cuantificación, se realizan curvas de calibración para los compuestos activos incorporados en las películas (Anbinder, 2011).

#### 4.3.2.2. Métodos de detección y cuantificación

Los compuestos activos liberados hacia el simulante alimentario o alimento pueden analizarse y cuantificarse mediante técnicas cromatográficas como Cromatografía líquida de alta resolución con detección en el ultravioleta (HPLC-UV), Cromatografía gaseosa con detección de masas (GC-MS) y Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID), entre otras técnicas (Dopico-García y col., 2003; Granda-Restrepo y col., 2009; Ribeiro-Santos y col., 2017; Cordón, 2017; Juárez Mendez, 2019; Solano y Valderrama Solano, 2008).

Los simulantes, previo a su análisis, deben ser acondicionados para cada técnica en cuestión. Pueden concentrarse previamente por evaporación utilizando un baño de agua a 60 °C y circulando nitrógeno gaseoso (López de Dicastillo y col., 2011; Cordón, 2017). Los residuos secos resultantes son tratados adecuadamente para ser analizados por los métodos anteriormente mencionados. En el caso de HPLC-UV, dichos residuos se redissuelven en los solventes de la fase móvil y se filtran (López de Dicastillo y col., 2011). Para el caso de GC-MS, los mismos se diluyen en un solvente orgánico en agitación para favorecer el desprendimiento de los componentes.

#### 4.3.2.3. Descripción de mecanismos de liberación del compuesto activo

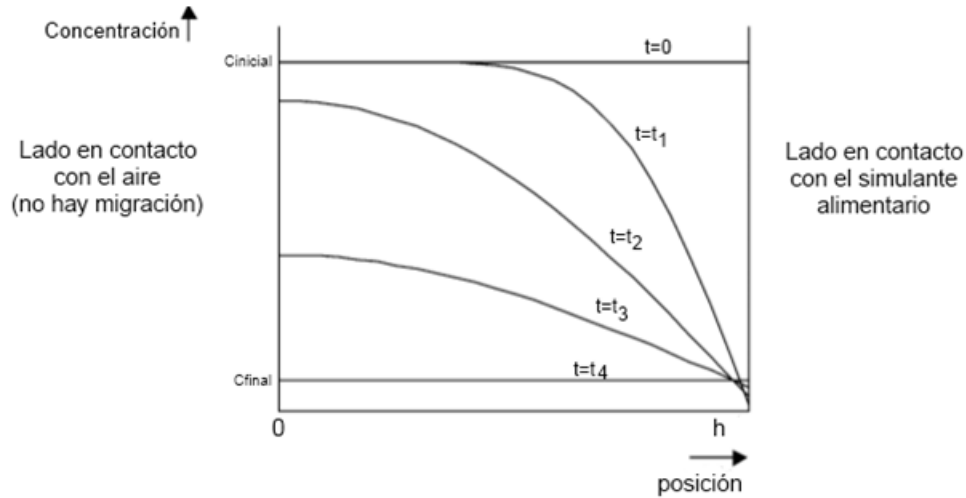
La migración de los componentes a través del envase y posterior contacto con el producto alimenticio puede resumirse en tres etapas: 1) *difusión del migrante en la matriz polimérica*, 2) *disolución en la interfase envase-alimento* y 3) *dispersión en el alimento* (Anbinder, 2011; Campos Campos, 2017).

##### 1) *Difusión del migrante en la matriz polimérica*

Esta primera etapa es la más lenta y determina la velocidad del proceso global (Lamarra, 2019). Está controlada por la transferencia de masa del migrante a través de los espacios libres transitorios originados por el movimiento browniano de las cadenas poliméricas (Anbinder, 2011). La temperatura de transición vítrea del polímero ( $T_g$ ) (temperatura a la cual existe una restricción en la rotación molecular de los enlaces simples) (Brydson, 1999) juega un papel fundamental en el proceso al determinar la movilidad del mismo. Cuando las cadenas se encuentran en estado vítreo ( $<T_g$ ), la posibilidad de que una molécula migrante encuentre suficiente espacio para atravesarla es limitada. Por otra parte, cuando las cadenas se encuentran en “estado gomoso” ( $>T_g$ ), las moléculas presentan alta flexibilidad, facilitando el paso del migrante (Helmroth y col., 2002).

Debido a que en la mayoría de los casos el proceso es netamente difusional, el transporte molecular previamente mencionado responde a las leyes de Fick para difusión, según las cuales se produce un flujo de migrante en la dirección contraria a la diferencia de concentración a lo largo del espesor del polímero como se observa en la **Figura 15** (Navia y col., 2014; Anbinder, 2011; Helmroth y col., 2002).

**Figura 15.** Perfiles de concentración del migrante en películas plásticas de espesor  $h$  y en contacto con simulante alimentario luego de distintos tiempos de incubación



(Fuente: Helmroth y col., 2002)

El grado del proceso de difusión puede entonces ser descrito a partir de la segunda ley de Fick, mediante la siguiente ecuación (Ec.1):

$$\frac{\partial C_a^E}{\partial t} = D_a^E \frac{\partial^2 C_a^E}{\partial x^2} \quad \text{Ec. 1}$$

donde " $C_a^E$ " representa la concentración de la especie migrante " $a$ " en el envase " $E$ "; " $t$ " es el tiempo; " $x$ " la dimensión lineal de la migración y " $D_a^E$ " es la difusión de " $a$ " en " $E$ " (Navia y col., 2014).

En ausencia de reacciones químicas o evaporación, la cantidad inicial de " $a$ " (en nuestro caso HL) presente en el material de envase " $E$ " es igual a la suma de la cantidad total que migra en el alimento después del tiempo " $t$ ", más la cantidad remanente en el envase. Esto es válido en cualquier instante (Ec. 2) y en el infinito (Ec. 3). La ecuación general del balance de masa queda entonces de la siguiente manera:

$$M_a^E(t) = M_a^E(t) + M_a^A(t) \quad \text{Ec. 2}$$

$$M_a^E(\infty) = M_a^E(\infty) + M_a^A(\infty) \quad \text{Ec. 3}$$

donde " $M_a^i(t)$ " representa la masa de " $a$ " en la fase " $i$ " ( $E$  empaque;  $A$  alimento) en el tiempo " $t$ " (Navia y col., 2014).

Para el caso en el que el proceso de migración es controlado por el mecanismo de difusión del migrante a través del material de envase y además, el migrante esté uniformemente distribuido en el alimento, se puede utilizar la resolución analítica de la segunda ley de Fick



propuesta por Crank (1979), utilizada para la determinación del coeficiente de difusión ( $D$ ) en sistemas unidimensionales y con un volumen limitado (finito) como es el caso de envases y alimentos (**Ec. 4**):

$$M_t = M_e \left[ 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{D(2n+1)^2\pi^2 t}{4h^2}\right) \right] \quad \text{Ec. 4}$$

donde  $M_t$  y  $M_e$  es la masa del migrante en el medio a un tiempo  $t$  (s) y al alcanzar el equilibrio (en el medio) respectivamente;  $h$  el espesor de la película (cm);  $D$  el coeficiente de difusión del migrante en el polímero ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) y  $t$  el tiempo de contacto (s) (Anbinder, 2011; Navia y col., 2014).

Utilizando las primeras etapas del proceso difusivo y si el tiempo es lo suficientemente corto ( $M_t/M_e < 0,6$ ), la difusión Fickeana a través de una fina película polimérica puede resumirse según la **Ec. 5** (Ritger y Peppas, 1987; Anbinder, 2011):

$$\frac{M_t}{M_e} = \left(\frac{4}{\sqrt{\pi}}\right) \left(\sqrt{\frac{D \cdot t}{h^2}}\right) \quad \text{Ec. 5}$$

La cinética de liberación de los componentes activos desde una matriz polimérica es afectada por dos fenómenos físico-químicos; la absorción de agua (u otro solvente) por parte de la película y la relajación de las cadenas poliméricas. Al ponerse en contacto la película con un medio fluido (agua o medios fisiológicos) la misma comienza a hincharse y puede tener lugar la disolución del compuesto activo (para polímeros con una Tg superior a la temperatura ambiente). El hinchamiento implica la transición de un estado vítreo a un estado gomoso y cuando la cantidad de líquido supera un valor umbral, las cadenas de polímeros se despliegan, aumentando la difusión del componente activo a través de ellas (Lamarra, 2019). Estos mecanismos pueden ser descritos a partir de la **Ec. 6** (Llabot y col., 2004; Ritger y Peppas, 1987):

$$\frac{M_t}{M_e} = kt^n \quad \text{Ec. 6}$$

donde " $k$ " es una característica del sistema (constante cinética) y  $n$  es el exponente que indica el mecanismo del proceso. Un valor de  $n=0,5$  indica una liberación Fickeana (controlada por difusión) y  $n=1$  indica un mecanismo enteramente controlado por la relajación de las cadenas donde la velocidad de liberación es constante (Caso II o liberación de orden cero). Valores entre 0,5 y 1 indican comportamientos intermedios cinéticos no-Fickeanos correspondientes a mecanismos de difusión y relajación acoplados (Ritger y Peppas, 1987). Valores de  $n>1$  (denominados transporte Super Caso II) serían consecuencia de un proceso de plastificación como resultado de una reducción de las fuerzas de atracción entre las cadenas poliméricas, relajándose y permitiendo que el migrante difunda a través de ellas (Ferrero y col., 2000; Ranga Rao y col., 1988; Llabot y col., 2004; Lamarra, 2019). Esto último demuestra la importancia de la movilidad de las cadenas en la

cinética de liberación como se ha mencionado anteriormente, aumentando el coeficiente de difusión al aumentar la relajación de las mismas (Anbinder, 2011).

### 2) Disolución en la interfase envase-alimento

En esta segunda etapa se produce un equilibrio químico en la interfase envase-alimento, debido a la solvatación o disolución de los migrantes en el producto alimenticio (Anbinder, 2011). La misma puede explicarse a través del coeficiente de partición  $k$ , que describe la relación de concentraciones en equilibrio del migrante en el envase ( $E$ ) y el alimento ( $A$ ) una vez alcanzado el mismo como se muestra a continuación (**Ec. 7**) (Tehrany y Desobry, 2004):

$$k = \frac{C_E}{C_A} \quad \text{Ec. 7}$$

Cuando  $k=1$ , la concentración del migrante en el envase es igual a la concentración en el alimento, en equilibrio. Cuando  $k \gg 1$ , la concentración de equilibrio en el envase es mucho mayor que en el sustrato alimenticio. En otras palabras, el migrante tiene mayor afinidad por el envase y por lo tanto la velocidad de difusión desde la matriz polimérica hacia el alimento es baja. Por el contrario, si  $k \ll 1$ , el migrante difundirá fácilmente (en un proceso de “extracción”) desde el envase al alimento (Anbinder, 2011).

### 3) Dispersión en el alimento

En esta última fase, el migrante está solvatado por el alimento. En el caso de alimentos sólidos o muy viscosos que no sufren manipulaciones que agiten su contenido, el migrante difundirá a través del alimento según las mismas leyes que gobiernan la primera etapa (difusión y/o relajación). Por otro lado, si se trata de alimentos líquidos en agitación continua, la presente etapa no será considerada, suponiendo que el migrante se encuentra distribuido homogéneamente disuelto en el alimento (Campos Campos, 2017; Anbinder, 2011).

En definitiva, los procesos de migración pueden ser descriptos a partir de la cinética de difusión de los componentes activos en la matriz polimérica, los cuales se expresan a través del coeficiente de difusión ( $D$ ). Para el cálculo de éste último se utilizan soluciones analíticas de la segunda ley de Fick (**Ec. 1**) realizando (Soto-Cantú y col., 2008; Hamdani y col., 1997) las siguientes aproximaciones:

- El componente activo difunde únicamente hacia el alimento.
- La concentración del componente activo en la película disminuye durante el contacto (envase finito).
- El volumen del alimento es mucho mayor que el de la película.
- El tiempo de contacto es considerablemente corto ( $M_t/M_e < 0,6$ ).

Aplicando las aproximaciones anteriormente mencionadas a la **Ec. 4**, se puede llegar a la siguiente resolución (**Ec. 8**):

$$\frac{M_t}{M_e} = \frac{2}{h} \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi}} \quad \text{Ec. 8}$$

donde " $M_t$ " es la masa del componente activo que difunde hacia el alimento luego de un tiempo  $t$ ; " $M_e$ " es la masa del componente activo que difunde hacia el alimento luego de alcanzar el equilibrio;  $h$  es el espesor de la película;  $D$  es el coeficiente de difusión y  $t$  el tiempo (Soto-Cantú y col., 2008).

El  $D$  puede ser calculado finalmente de la pendiente ( $S_{a,e}$ ) al graficar  $M_t/M_e$  vs  $t^{1/2}$  de acuerdo con la siguiente expresión (**Ec. 9**):

$$D = \frac{\pi}{4} (S_{a,e} \cdot h)^2 \quad \text{Ec. 9}$$

Asimismo, autores como Korsmeyer y col. (1983), Ritger y Peppas (1987) desarrollaron modelos semiempíricos sencillos que relacionan la liberación del componente activo con el tiempo a través de una ecuación exponencial, en aquellos casos en los que el mecanismo de difusión presenta un comportamiento Fickeano o se desvía de él (**Ec. 6**).

### **4.3.3. Caracterización de las películas activas**

Las películas exhiben diversas y numerosas características sujetas a continuos análisis y estudios que permiten el desarrollo de nuevas tecnologías en el área de los materiales y en el envasado de alimentos. Dentro de ellas, se evalúan aspectos visuales como transparencia, color, grosor, fundamentales para la aceptación y percepción por parte del consumidor, permeabilidad frente a distintos gases como vapor de agua, CO<sub>2</sub>, oxígeno, relacionado con sus propiedades de barrera y la vida útil de los alimentos, y propiedades mecánicas, que determinan el comportamiento y la resistencia de las mismas frente a la acción de fuerzas externas y/o deformaciones que pueden sufrir. A continuación, se describen las técnicas mayormente utilizadas para la caracterización de películas.

#### **4.3.3.1. Determinación del espesor**

El espesor de las películas se determina mediante el uso de micrómetros (**Figura 16**) realizando varias medidas (entre 5 y 10) en distintos puntos de las mismas con el fin de obtener un resultado de mayor precisión (Peltzer y col., 2018 b; Bertuzzi y col., 2007; Zhang y Han, 2006; Nývák y col., 2012).

**Figura 16.** Micrómetro Digital 0-25 Mm Insize 3109-25a



#### 4.3.3.2. Determinación de la transparencia

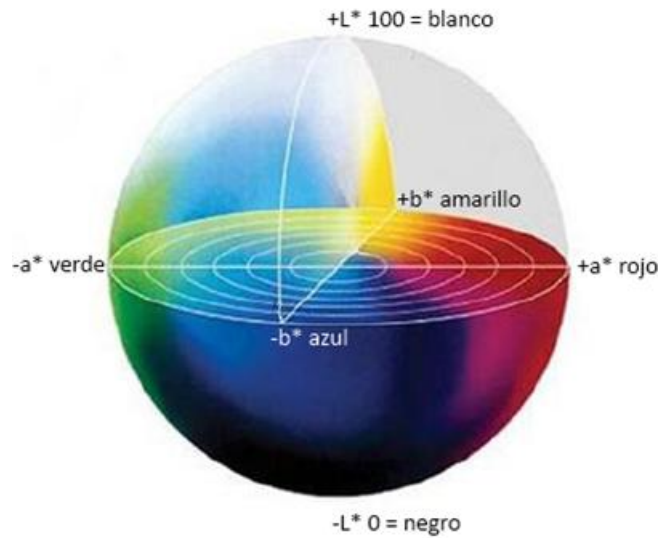
La transparencia de las películas puede evaluarse mediante espectroscopía UV-Visible en el rango de longitud de onda entre 200-800 nm colocando una tira rectangular de la misma en la celda y utilizando el aire como referencia (Ciannamea y col., 2015). Una baja absorbancia en la región UV-Visible (400-700 nm) implica una mayor transparencia en las películas (Anbinder, 2011; Hu y col., 2009; Peltzer y col., 2018 b).

#### 4.3.3.3. Determinación del color mediante coordenadas CIELAB

Los ensayos colorimétricos se llevan a cabo mediante el uso de un colorímetro, que puede ser portátil o no. La película se deposita sobre un plato blanco estándar y se toman sucesivas medidas en distintos puntos de su superficie apoyando la parte inferior del dispositivo contra las mismas (Kunte y col., 1997). Los valores obtenidos se expresan en las coordenadas del espacio colorimétrico CIELAB, que consta de un sistema cartesiano definido por tres coordenadas colorimétricas:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (Figura 17), que permiten describir el color de cualquier objeto (Gende y col., 2013; Ciannamea y col., 2015; Kunte y col., 1997).

- $L^*$ : Indica la luminosidad, es decir, la cantidad de luz percibida que refleja o transmite un material. Puede tomar valores entre 0 y 100.
- $a^*$ : Indica la saturación o desviación del punto acromático  $L^*$  hacia el rojo ( $a^* > 0$ ) o hacia el verde ( $a^* < 0$ ).
- $b^*$ : Es el ángulo de tono que define la desviación de  $L^*$  en el eje amarillo ( $b^* > 0$ ) o azul ( $b^* < 0$ ).

**Figura 17.** Parámetros del CIELAB



(Adaptado de Rezzani, 2018)

#### 4.3.3.4. Determinación de la estructura

La morfología y la estructura interna de las películas pueden ser examinadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) por observación superficial y transversal (Tanada-Palmu y Grosso, 2003; Jost y Stramm, 2016; Novák y col., 2012; Anbinder, 2011). En el primer caso, se cortan las películas en pequeños trozos y se fijan a un portaobjetos conteniendo una suspensión de carbón (Novák y col., 2012). En el segundo caso, se lleva a cabo la fractura de la película sumergiéndola previamente en nitrógeno líquido para evitar generar daños o rebordes mediante el uso de tijeras (Novák y col., 2012; Anbinder, 2011).

Asimismo, la Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica muy utilizada en el estudio de la estructura de las películas (Novák y col., 2012; Anbinder, 2011; Gao y col., 2006; Peltzer y col., 2018 b) debido a que nos brinda información acerca de la naturaleza de las biomoléculas como lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, a través de una serie de bandas identificables de grupos funcionales en la región electromagnética del infrarrojo medio (Mata-Miranda y col., 2017). En la **Figura 18** se muestra un ejemplo del equipo de medición.

**Figura 18.** Equipo FTIR Pike GladiATR



#### **4.3.3.5. Determinación de la solubilidad en agua**

La solubilidad depende de la capacidad de interacción del solvente con el soluto, de manera que ésta debe ser mayor que la capacidad de interacción de las partículas del soluto entre sí. La solubilidad en agua de las películas es importante según la aplicación de un determinado material; en algunos casos, son requeridas películas insolubles en agua para mejorar la integridad del producto y la resistencia a la humedad del envase; en otros, la total o parcial disolución de la película antes del consumo del producto puede ser de mucha ayuda, como en alimentos o aditivos encapsulados (López y García, 2012).

Para la determinación de la solubilidad de las películas en agua (*S.A*), primeramente se determina el peso seco inicial ( $M_o$ ) de las mismas cortando discos de 2 cm de diámetro (aproximadamente) y secándolos en estufa a 40, 60 o 105 °C hasta peso constante (Hu y col., 2009; Novák y col., 2012; Tanada-Palmu y Grosso, 2003). Luego, se sumergen en 50 mL de agua destilada a 25 °C con agitación (leve) durante 24 hs en un vaso precipitado sellado, con la finalidad de evitar pérdidas por evaporación y posible contaminación (Hu y col., 2009; Novák y col., 2012; Tanada-Palmu y Grosso, 2003). Posteriormente, se retiran y se secan nuevamente en estufa hasta peso constante en las mismas condiciones anteriormente mencionadas y finalmente se pesan ( $M$ ). La *S.A* se determina a partir de la siguiente **Ec. 10**:

$$S.A (\%) = 100 \% \frac{(M_o - M)}{M_o} \quad \text{Ec. 10}$$

#### **4.3.3.6. Permeabilidad al vapor de agua ( $P_w^{\text{exp}}$ )**

Las propiedades de barrera, como la permeabilidad de los materiales poliméricos usados en la industria del envasado de alimentos, son especialmente importantes, ya que el envase debe

proteger el alimento de la entrada de oxígeno, humedad, olores y sabores externos, para conseguir aumentar el tiempo en que permanece en condiciones óptimas para su consumo (Rezzani, 2018).

La  $P_w^{exp}$  puede determinarse por el método ASTM E-96 (*Standard Test Methods for Water Vapour Transmission of Materials*) utilizando una celda como se muestra en la **Figura 19**. Las películas son acondicionadas durante diez días a 24 °C con una humedad relativa de 43%. Luego, las mismas son selladas en la parte superior de la celda la cual contiene una solución saturada de cloruro de bario ( $BaCl_2$ ) que provee una humedad relativa del 90% (Delgado y col., 2018 b; Ciannamea y col., 2015). La celda es depositada en un desecador al 10% de humedad relativa conferida por una solución saturada de hidróxido de sodio (NaOH). Se colocan ventiladores en el interior del desecador con el fin de mantener uniformes las condiciones del ensayo. Los experimentos se llevan a cabo a 24 °C (Delgado y col., 2018 b; Peltzer y col., 2018 b).

**Figura 19.** Esquema de la celda utilizada para determinar la  $P_w^{exp}$  en películas



(Fuente: Delgado y col., 2018 b)

Las pérdidas de peso se controlan pesando la celda en balanza analítica ( $\pm 10^{-3}$  g). Se realizan gráficos de la pérdida de peso en función del tiempo y una vez alcanzado el estado estacionario (línea recta), luego de 10 hs, se registra dicho valor. De la pendiente de la recta calculada por regresión lineal de la pérdida de peso en el tiempo ( $\Delta m/\Delta t$ ), se obtiene el flujo de vapor de agua a través de la película ( $J_w$ ) (Delgado y col., 2018 b) como se muestra en la **Ec. 11**:

$$J_w = \frac{1}{A} \left( \frac{\Delta m}{\Delta t} \right) \quad \text{Ec. 11}$$

donde  $A$  es el área expuesta de la película ( $m^2$ ). Finalmente, la  $P_w^{exp}$  se calcula de la siguiente manera (**Ec. 12**):

$$P_w^{exp} = \frac{J_w \cdot L}{\Delta P_w} \quad \text{Ec. 12}$$

donde  $L$  es el grosor de la película;  $\Delta P_w = (P_{w2} - P_{w1})$  es la diferencia de presión parcial del vapor de agua a través de la película,  $P_{w1}$  y  $P_{w2}$  son las presiones parciales del vapor de agua en la superficie externa de la película y dentro de la celda respectivamente, entre el nivel de la solución saturada de  $BaCl_2$  y la posición de la película (Delgado y col., 2018 b; Peltzer y col., 2018 b).

#### 4.3.3.7. Determinación de la permeabilidad al $CO_2$

La misma se puede evaluar mediante la técnica de acumulación que se basa en la medida de la concentración de  $CO_2$  difundido a través de la película, en una celda de acero inoxidable formada por dos cámaras y separadas por la película como se muestra en la **Figura 20** (Anbinder, 2011). Para las medidas se utiliza un cromatógrafo gaseoso, un detector de conductividad térmica y helio (He) como gas portador. Los experimentos se llevan a cabo a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  y 75% de humedad relativa (Anbinder, 2011).

**Figura 20.** Celda utilizada en los ensayos de permeabilidad al  $CO_2$



(Fuente: Anbinder, 2011)

Para su determinación, se hace pasar continuamente el gas de prueba por una de las cámaras de la celda hasta alcanzar una concentración del 100% (no se observan otros picos en el cromatograma). A partir de este momento, se toman periódicamente muestras en la cámara opuesta (que contiene inicialmente aire) y se mide el área bajo la curva correspondiente al gas de interés, el cual se irá incrementando a medida que el mismo atraviesa la película. Con estos



valores, relacionándolos con la curva de calibración (que se obtiene inyectando diferentes volúmenes conocidos del gas) se consigue el valor del volumen de gas de interés en la mezcla aire-gas (permeante) vs tiempo (Anbinder, 2011).

Finalmente, la permeabilidad al CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) se determina mediante la siguiente **Ec. 13**:

$$P_{CO_2} = \frac{q \cdot L}{\Delta P \cdot A \cdot t} \quad \text{Ec. 13}$$

donde  $P_{CO_2}$  está expresada en unidades Barrer (1 Barrer = 10<sup>-10</sup> cm<sup>2</sup> /cmHg.s);  $q$  es el flujo de permeante que atraviesa la película por unidad de tiempo ( $t$ ) (cm<sup>3</sup>/s);  $L$  es el espesor de la película;  $\Delta P$  es la diferencia de presión en ambos lados de la película (atm) y  $A$  es el área de permeación efectiva (cm<sup>2</sup>) (Anbinder, 2011).

#### 4.3.3.8. Permeabilidad al oxígeno: Tasa de Transferencia de Oxígeno (OTR)

Se utilizan equipos de permeabilidad al oxígeno que monitorean la cantidad de oxígeno que atraviesa a las películas por unidad de tiempo y área. Para el mismo, se cortan las películas en forma de disco (14 cm de diámetro) y se colocan en la cámara de difusión del equipo a 25 °C. Los resultados medidos, luego de alcanzarse el estado estacionario, se expresan como OTR (cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>.día) (Ciannamea y col., 2015). En la **Figura 21** se muestra un ejemplo del equipo de medición.

**Figura 21.** C201B Oxygen Transmission Rate Test System. Labthink



#### 4.3.3.9. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Es una técnica utilizada para estudiar las características físico-químicas y las reacciones de descomposición de los materiales, en el cual se registra la pérdida de peso de una muestra a

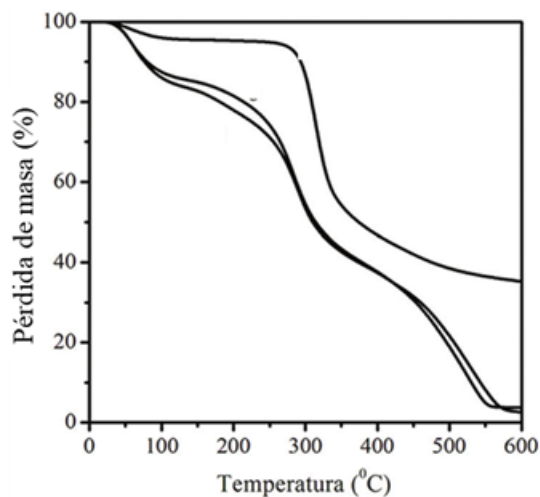
medida que se incrementa la temperatura, bajo condiciones controladas de velocidad de calentamiento y diferentes atmósferas de reacción; obteniéndose por esta vía las curvas denominadas TG o termogramas y las curvas de análisis termogravimétrico diferencial (Manals-Cutiño y col., 2011). Para el análisis de películas como las propuestas en este trabajo, se utiliza una termobalanza (**Figura 22**) y se pesan entre 5-10 mg de película en balanza de platino y se las somete a un proceso de calentamiento desde 30 °C hasta 550 °C a 20 °C min<sup>-1</sup> en atmósfera de nitrógeno inerte (Delgado y col., 2018 a; Peltzer y col., 2018 b; Gao y col., 2016).

**Figura 22.** Equipo de análisis termogravimétrico



Un ejemplo de las gráficas que se obtienen de estas mediciones son las que se muestran en la **Figura 23**, en donde se observa la pérdida de peso del material en función de la temperatura.

**Figura 23.** Gráficas obtenidas en el TGA



#### 4.3.3.10. Determinación de las propiedades mecánicas

La ductilidad de las películas se evalúa mediante el uso de un equipo de ensayo universal (Zhang y Han, 2006; Novák y col., 2012; Anbinder, 2011; Ciannamea y col., 2015; Delgado y col., 2018 a; Peltzer y col., 2018 b; Gao y col., 2016; Hu y col., 2009; Tanada-Palmu y Grosso, 2003). Para la medición de las propiedades mecánicas se cortan probetas de dimensiones determinadas por la norma ASTM D882. Dichas probetas se colocan en las mordazas del equipo a una distancia determinada (Zhang y Han, 2006). El equipo registra la fuerza ( $F$ ) vs deformación hasta ruptura, de donde se obtienen los parámetros tales como máxima tensión ( $M_T$ ), elongación (%e) y módulo de Young ( $E$ ). El primero, puede calcularse a partir de la siguiente **Ec. 14**:

$$M_T = F/A \quad \text{Ec. 14}$$

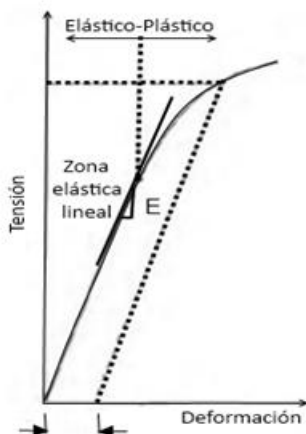
donde  $F$  es la fuerza máxima normal al área (N) y  $A$  el área de la película ( $\text{mm}^2$ ), que puede calcularse fácilmente mediante el ancho y su espesor ( $L$ ) (Carvajal Buenahora y González Barragán, 2014).

El segundo, se obtiene a partir de la relación de longitudes entre el máximo desplazamiento de la película hasta su ruptura ( $L_{est}$ ) y la distancia inicial entre mordazas ( $L_0$ ) (Carvajal Buenahora y González Barragán, 2014) de la siguiente manera (**Ec. 15**):

$$\% e = \left( \frac{L_{est}}{L_0} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 15}$$

El tercero, se calcula a partir de la pendiente de la recta tangente de la gráfica tensión vs deformación en la región elástica-lineal como se muestra en la **Figura 24** (Carvajal Buenahora y González Barragán, 2014).

**Figura 24.** Recta tangente en la zona elástica-lineal



(Fuente: López Ramírez y Timote Briñez, 2017)

#### 4.3.4. Evaluación de la funcionalidad de las películas activas

##### 4.3.4.1. Evaluación de la capacidad antioxidante de las películas activas

La evaluación de la capacidad antioxidante de las películas se puede medir mediante técnicas espectrofotométricas como el ensayo del 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH) y 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). Es posible medir la capacidad directamente sobre la película o de los extractos de migración obtenidos a partir de los ensayos mencionados en la sección 4.3.2.1. A continuación, se describe en detalle cada una de ellas.

##### DPPH

Se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH• que en su forma estable absorbe a una longitud de onda de 515 nm (Kuskoski y col., 2005; Apodaca Mendoza y Castañeda Palafox, 2012). La reducción del mismo se puede monitorear experimentalmente mediante la disminución de la absorbancia a dicha longitud de onda al combinarse con un antioxidante (AH) u otra especie radical (R•) como se muestra en las siguientes **Reacciones 6 y 7** (Lamarra, 2019):



Para llevar a cabo el ensayo, en primer lugar se prepara una solución madre de DPPH en metanol al 0,024%. A partir de ésta, se prepara una solución con volúmenes de solución madre/metanol hasta alcanzar una absorbancia de  $1,1 \pm 0,02$  unidades medida en el espectrofotómetro a 515 nm (Apodaca Mendoza y Castañeda Palafox, 2012).

En el caso de evaluar la capacidad antioxidante directamente en las películas, se cortan aproximadamente 125 mg (equivalentes a  $26 \text{ cm}^2$ ) de muestra, se colocan en un matraz conteniendo 25 ml de la solución madre y se las deja reposar durante 30 min en oscuridad con agitación (Apodaca Mendoza y Castañeda Palafox, 2012; Kuskoski y col., 2005). Transcurrido dicho tiempo, se mide la absorbancia a 515 nm y se calcula la actividad antiradicalaria (ARA) a partir de la siguiente expresión (**Ec. 16**):

$$\% \text{ ARA} = 100 \left( 1 - \frac{Am^{515}}{Ab^{515}} \right) \quad \text{Ec. 16}$$

donde % ARA es la actividad antioxidante en 100 mg de película;  $Am^{515}$  la absorbancia de la muestra y  $Ab^{515}$  la absorbancia del blanco (ambos medidos a 515 nm) (Apodaca Mendoza y Castañeda Palafox, 2012). A su vez, se realiza una curva de calibración (compuesto activo vs % ARA) en un rango de 0-100  $\mu\text{g/ml}$  con la finalidad de expresar la actividad antioxidante en función de la concentración del compuesto activo. Para ello, se adicionan alícuotas de cada



#### 4.3.4.2. Evaluación de la efectividad antimicrobiana de las películas activas

La capacidad antimicrobiana de las películas se puede evaluar mediante ensayos de difusión en agar, ya que es una técnica sencilla y que da buenos resultados. Además, es una de las más utilizadas para medir la sensibilidad in vitro de los microorganismos a un compuesto antimicrobiano.







Consiste básicamente en enfrentar un inóculo bacteriano estandarizado a una única o a diferentes concentraciones de un antimicrobiano (Cercenadoa y Saavedra-Lozanob, 2009).

El fundamento se basa en que el antimicrobiano durante la incubación de las placas (previamente inoculadas con el microorganismo y con discos con el antimicrobiano de concentración conocida) difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del mismo. Luego de 24 horas, se observará un halo de inhibición alrededor del disco indicando la sensibilidad del microorganismo frente al antimicrobiano. El diámetro del área de inhibición alrededor de éste puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos (por ejemplo el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica) (Aulacio, 2002).

Para la determinación del ensayo en películas, se colocan 100 µl de un inóculo de concentración  $1 \times 10^6$  UFC/ml de *E. coli* o *S. aureus* sobre placas de petri con agar Mueller Hinton (Resa y col., 2014; Zendejas-Manzo y col., 2014; ANMAT, 2011).

Luego, se cortan las películas activas en discos de 7 mm de diámetro y se depositan sobre las placas previamente inoculadas. Estas se incuban a 37 °C durante 24-48 hs. Por último, la actividad inhibitoria se determina a partir de la medida del diámetro del halo de inhibición (Resa y col., 2014). A modo de ejemplo, en la **Figura 25** se indican los resultados en función del tamaño del halo de inhibición.

**Figura 25.** Grado de inhibición en función del diámetro del halo exhibido

Zona de inhibición presente > 1 mm		Bueno
Zona de inhibición presente < 1 mm		Muy bueno
Ausencia de crecimiento bacteriano en la muestra		Suficiente
Crecimiento bacteriano limitado en la muestra		Limitado
La muestra es parcialmente (50%) habitada por la bacteria		Insuficiente
La muestra es totalmente habitada por la bacteria		Insuficiente

(Fuente: Pollini y col., 2009)

#### **4.3.5. Incorporación de HL en envases activos**

##### **4.3.5.1. Antecedentes**

Como se ha mencionado con anterioridad, un envase activo es aquel que interactúa de manera positiva con el producto alimenticio y su entorno en beneficio de la mejora de la aceptabilidad por parte de los consumidores, calidad y seguridad al alargar la vida útil de los alimentos. Las propiedades intrínsecas del HL, presentadas y demostradas en estudios mencionados previamente, son de suma importancia a nivel industrial debido a la demanda del mercado mundial hacia productos frescos, mínimamente procesados y naturales. Debido a todo ello, el uso de HL en envases activos es de gran interés en la comunidad científica que busca permanentemente nuevas alternativas en referencia al uso de compuestos activos naturales.

Soazo y col. (2016) desarrollaron películas a base de proteína de soja incorporando HL con el objetivo de estudiar la capacidad antimicrobiana, mediante ensayos por difusión, y la influencia del HL en las características fisicoquímicas de las películas. Dichos autores concluyeron por un lado, que las películas desarrolladas fueron efectivas frente a *L. monocytogenes*. Asimismo, no se observó crecimiento en placas inoculadas con *E. coli*, *S. aureus* y *S. Typhimurium*. Por otro lado, la

incorporación de HL a dichas películas mejoró las propiedades mecánicas de resistencia aumentando los valores de tensión; un aspecto deseado en la elaboración de envases debido a que preserva la integridad de la película durante el procesamiento y manipulación. A su vez, las películas a base de proteína de soja mostraron cambios de color hacia un marrón más atractivo y de menor transparencia al aumentar la concentración de HL en su formulación.

Otros estudios incorporaron HL en películas de gelatina con la finalidad de mejorar las propiedades mecánicas y de barrera frente al vapor de agua (Wang y col., 2016 b). Los resultados indicaron un aumento en la tensión y un descenso en la elongación de las películas, relacionados con la concentración de HL. Además, la incorporación de HL mejoró las propiedades de barrera al vapor de agua, lo cual se evidenció a través de los resultados del estudio de la permeabilidad al vapor de agua y el ángulo de contacto. Por otra parte, el análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) mostró una leve mejoría en la estabilidad térmica de dichas películas formuladas con HL. También, el agregado de HL condujo a una disminución en la transparencia y a la formación de películas de gelatina con menor solubilidad en agua. De acuerdo a los espectros FTIR y el grado de entrecruzamiento detectado, todas las mejoras anteriormente señaladas se atribuyen a la interacción, que se produce mediante reacciones nucleofílicas, entre los grupos carbonilos del HL y los grupos amida de la gelatina (Wang y col., 2016 b).

A su vez, Fathanah y col. (2018) elaboraron películas de almidón de piel de mandioca con quitosano, las cuales fueron aditivadas con HL (0, 1 y 2 ml). Los resultados indicaron que las películas con quitosano formuladas con 2 ml de HL presentaron los mayores valores de elongación (%e) y menores de absorción de agua. Los ensayos de degradabilidad demostraron que las películas con mayor porcentaje de HL presentaron un mayor tiempo de degradación (57 días).

#### **4.3.5.2. Potencialidad de uso en alimentos**

La demanda a nivel mundial de envases activos que proponen brindar calidad y seguridad al consumidor, puede ser abordada mediante la incorporación de HL en películas al mejorar las propiedades mecánicas, de barrera y otorgar capacidad antimicrobiana y antioxidante a las mismas como se ha demostrado con anterioridad.

Las diferencias exhibidas entre Hls enteros y refinados pueden ser una herramienta valiosa a la hora de su aplicación en películas, debido a que el uso de los mismos de manera individual o combinados podrían resaltar una gran variedad de características en el producto final. El aroma ahumado típico del HL entero puede favorecer el consumo de estos alimentos envasados al conferirle propiedades organolépticas deseadas. Por el contrario, el HL refinado (bajos niveles en fenoles) podría usarse en cualquier tipo de producto al no conferirle sabor ni olor al alimento, en contraposición al uso de aceites esenciales utilizados comúnmente en la elaboración de películas activas, que imparten un intenso aroma como se ha mencionado previamente.



### **4.3.5.3. Incorporación de HL refinado en películas a base de pared celular de levadura**

#### **4.3.5.3.1. Materia prima utilizada en la elaboración de las películas de pared celular de levadura activas (PPCL-HL)**

Para la elaboración de las películas activas se utilizó levadura panadera comercial marca CALSA (Argentina) y HL refinado (CLOUD S-6) suministrado por la empresa KERRY, Ingredients and Flavours (Estados Unidos).

#### **4.3.5.3.2. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar y fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) usando el software informático InfoStat (Di Rienzo y col., 2016). Las medias se determinaron por el test LSD Fisher para la comparación de medias, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$  ( $\alpha = 0,05$ ).

#### **4.3.5.3.3. Caracterización del HL**

##### **a) pH y acidez titulable (% ácido acético)**

El pH del HL se midió con un pH-metro (Alpha altronix TPA-V, Estados Unidos) a temperatura ambiente arrojando un valor igual a 5,05. La acidez titulable se determinó mediante titulación con NaOH 0,1N a pH 8,3. Previo a la titulación, la muestra de HL se diluyó en agua destilada (1:4 p/v) (Montazeri y col., 2013 a). La medida se realizó por duplicado, alcanzando un contenido de ácido acético igual a  $1,9 \pm 0,1\%$  p/v.

##### **b) Capacidad antioxidante mediante ensayo ABTS**

La capacidad antioxidante del HL se determinó por el método del ABTS según Re y col. (Re y col., 1999) mediante su comparación con la Vitamina C (Vit. C) y la determinación de  $IC_{50}$ . Para esto se preparó una solución compuesta por ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (2,45 mM) para la formación del catión radicalario  $ABTS^{*+}$  (solución A) y se conservó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas antes de su uso. Para la medición de la capacidad antioxidante, se diluyó 1 ml de solución A en 80 ml de agua mili Q (solución B). La dilución de solución B se ajustó hasta obtener una absorbancia entre  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm en un espectrofotómetro UV (Spectroquanta Pharo 2000, Merck, Estados Unidos).

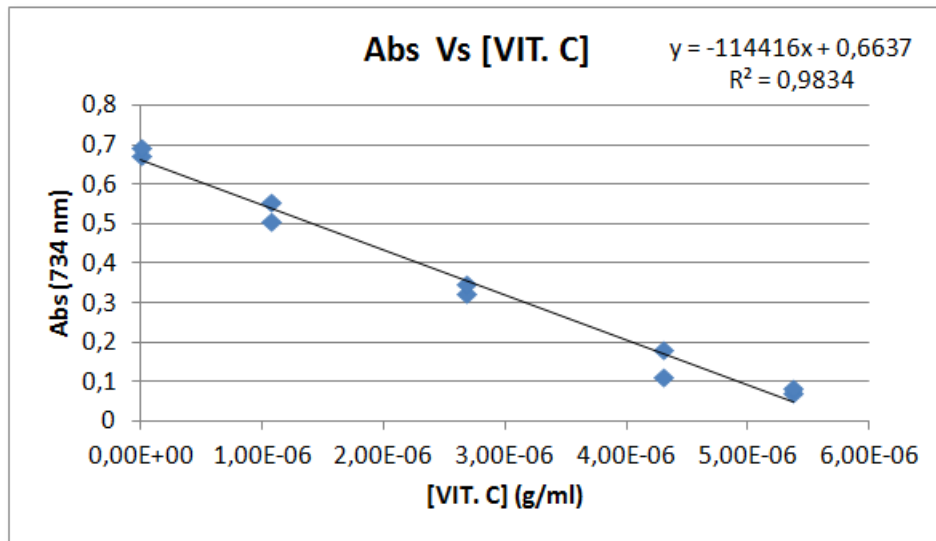
Se preparó una curva de calibración con soluciones patrón de Vit. C. Para esto, se pesaron 5 mg de L(+)-ácido ascórbico (Anedra, Research AG S.A.) y se mezclaron con 1 ml de agua Mili Q. Se diluyó esta solución hasta 1/100 ( $5,37 \times 10^{-5}$  g/ml) y a partir de ésta última se armó la curva con las diluciones que se muestran en la **Tabla 17**.

**Tabla 17.** Diluciones para la curva de calibración de la Vit. C

	<b>Blanco</b>	<b>1/50</b>	<b>1/20</b>	<b>1/12,5</b>	<b>1/10</b>
<b>Vit. C (μl)</b>	0	20	50	80	100
<b>Agua (μl)</b>	100	80	50	20	0
<b>Solución B ABTS<sup>•+</sup> (μl)</b>	900	900	900	900	900

Luego de la adición de los 900 μl del ABTS<sup>•+</sup> (solución B) a las soluciones patrón de Vit. C, se dejó reaccionar durante seis minutos en oscuridad. A continuación, se midió la absorbancia a 734 nm a cada uno de los puntos y a partir de los valores obtenidos se construyó la gráfica correspondiente como se muestra en la **Figura 26**.

**Figura 26.** Curva de calibración de la Vit. C



A partir de la ecuación de la recta obtenida (**Figura 26**), se calculó el IC<sub>50</sub> de la Vit. C. Este valor corresponde a aquella concentración de antioxidante que disminuye la absorbancia del blanco en un 50%. En el caso de la Vit. C utilizada en este trabajo se obtuvo un valor de IC<sub>50</sub> de 2,81 mg/L.

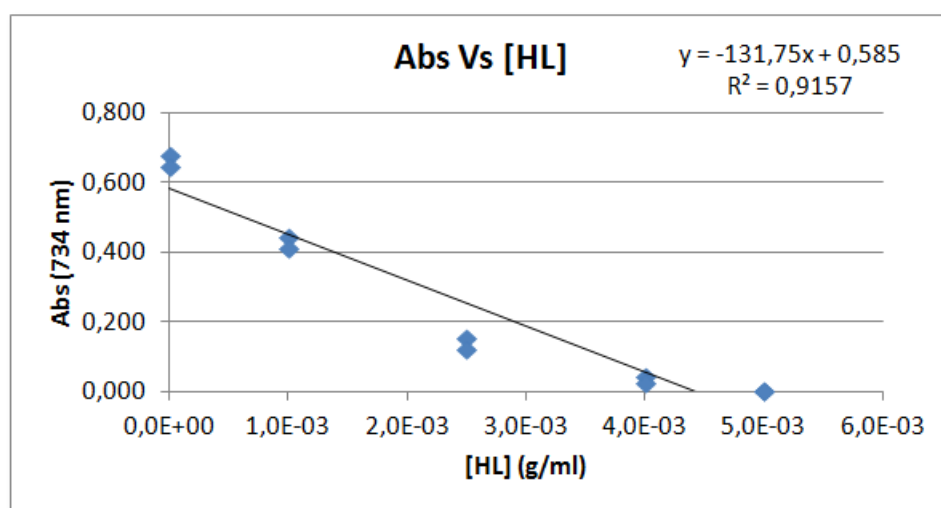
De la misma manera que para la Vit. C, se preparó una curva de calibración para el HL a partir de una solución de 0,05 g/ml. Las diluciones correspondientes se presentan en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Diluciones para la curva de calibración del HL

	Blanco	1/50	1/20	1/12,5	1/10
HL (μl)	0	20	50	80	100
Agua (μl)	100	80	50	20	0
Solución B	900	900	900	900	900
ABTS <sup>++</sup> (μl)					

Luego, se midió la absorbancia a 734 nm a cada una de las diluciones anteriores siguiendo el mismo procedimiento aplicado en el caso de la Vit. C y se graficó la concentración de HL en función de la absorbancia como se muestra en la **Figura 27**:

**Figura 27.** Curva de calibración del HL



A partir de la ecuación de la recta (**Figura 27**) se calculó el IC<sub>50</sub> del HL siendo éste el valor de 1920 mg/L. Otros compuestos antioxidantes extraídos de fuentes naturales como extractos de hojas de menta mostraron valores de 185,6 mg/L (Nikavar y col., 2008), mientras que el BHT presentó un valor de  $9,3 \pm 0,1$  mg/L (Sen-Utsukarci y col., 2019). Por otro lado, estudios realizados sobre compuestos fenólicos con reconocida actividad antioxidante como ácido gálico, timol, ácido cafeico y eugenol presentaron valores de IC<sub>50</sub> de 1,13; 1,39; 17,89; 22,58 mg/L, respectivamente (Badanai y col., 2015). Caprioli y col. (2019) estudiaron la actividad antioxidante de un extracto de ajedrea rico en carvacrol (22,5%), p-cimeno (17,6%) y timol (17,4%), el cual mostró un IC<sub>50</sub> de 560.86 mg/L.

En este trabajo el cálculo del IC<sub>50</sub> de la Vit. C dio un resultado de 2,81 mg/L. Comparando los resultados obtenidos con otros antioxidantes y el del HL, se concluye que éste último posee

una capacidad antioxidante moderada. Esto podría deberse a que al ser un HL refinado, el contenido en fenoles, responsables de la capacidad antioxidante, es reducido.

#### 4.3.5.3.4. Obtención de la pared celular de levadura

La pared celular fue obtenida por métodos mecánicos a partir de la preparación de dispersiones acuosas al 10% p/p en base seca de levadura panadera comercial (CALSA, Argentina). Se pesaron 300 gr de la misma y se llevó a un volumen final de 1 litro con agua destilada. A continuación, las dispersiones se trataron por homogeneización a 125 MPa (Homogeneizador a válvula, Panda 2K, GEA Niro-Soavi, Italia) durante 9 minutos en tres etapas. Posteriormente, la dispersión ya homogeneizada se centrifugó a 12000 rpm y 4 °C, durante 15 minutos (Beckman A-14, rotor J2 – MC, Beckman Coulter Inc., Estados Unidos). El precipitado obtenido se lavó con agua destilada y sucesivas centrifugaciones en las condiciones antes descriptas. Este procedimiento se realizó tres veces con el objetivo de separar eficientemente el material citoplasmático (soluble), de la pared celular (insoluble). Al finalizar los lavados, se recogió el material y se pesó obteniéndose una masa total de pared celular de levadura de 123,9 g.

#### Contenido de sólidos de la pared celular obtenida

Este procedimiento se llevó a cabo para realizar luego la dispersión filmogénica en base seca. El contenido de sólidos de la pared celular de levadura se determinó por secado en estufa a 105 °C durante 1 hora a partir de una muestra de peso conocido de pared celular de levadura. Los resultados obtenidos fueron de 18,6 % sólidos.

#### 4.3.5.3.5. Elaboración de las PPCL-HL

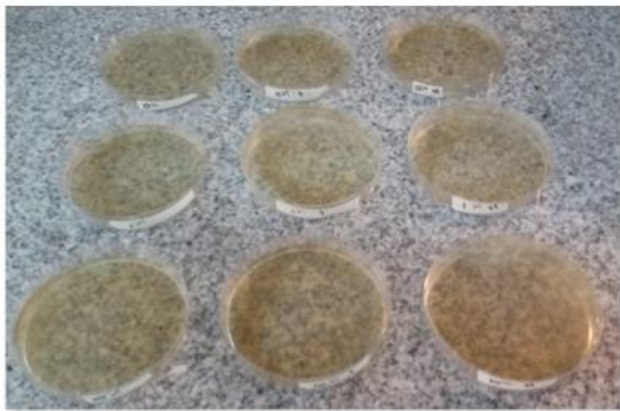
Se preparó una dispersión al 5% p/p (base seca) de pared celular de levadura, se llevó el pH de la misma a 10 con solución de NaOH 0,1M y se la sometió a un tratamiento térmico a 90 °C durante 20 minutos. Una vez que la dispersión llegó a temperatura ambiente, se añadió glicerol como plastificante al 25% (base seca) y el compuesto activo (HL) en concentraciones de 1 y 10% en peso (base seca), se agitó durante 30 minutos para homogeneizar la muestra y se preparó una muestra control sin el agregado de HL. Para controlar si el agregado de HL acidificaba la dispersión, se midió el pH final previo a la obtención de las películas (**Tabla 19**). Como se puede observar, existe una leve tendencia a que disminuya el pH con el agregado de HL.

**Tabla 19.** Masa (g) de HL y glicerol y medida del pH de la dispersión final para cada formulación

Masa dispersión (g)	% HL	Masa HL (g)	Masa glicerol (g)	pH dispersión
66,66	0	-	0,8325	9,82
66,66	1	0,033	0,8325	9,78
66,66	10	0,33	0,8325	9,56

Las películas se obtuvieron por el método de casting (evaporación del solvente) en placas de Petri a 35 °C entre 18-24 horas. En la **Figura 28** se muestra un ejemplo de las películas obtenidas, las cuales fueron translúcidas, de color amarillento y no presentaron grietas.

**Figura 28.** Películas obtenidas a base de pared celular de levadura

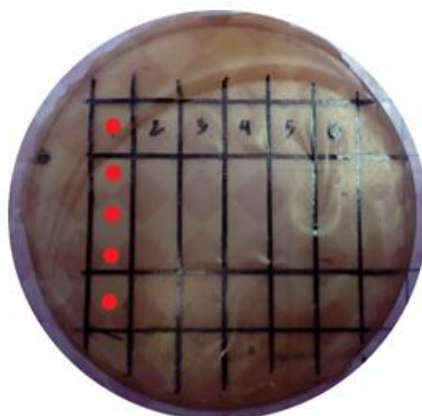


#### 4.3.5.3.6. Caracterización de las PPCL activas

##### Determinación del espesor

El espesor de las películas se midió con un micrómetro digital (**Figura 16**). Para su determinación se tomaron datos en cinco puntos diferentes de cada una de las 6 probetas obtenidas para cada formulación como se observa en la **Figura 29**, las cuales fueron utilizadas luego para la determinación de las propiedades mecánicas.

**Figura 29.** Zonas en las que se midió el espesor de las películas



Las películas mostraron una disminución en el espesor con el aumento de la concentración de HL en la formulación de las mismas (**Tabla 20**). Esto puede deberse a que las muestras con HL poseen inicialmente un mayor contenido de agua que durante el proceso de casting se evapora, quedando una menor cantidad de sólidos en cada película y por lo tanto un espesor menor.

**Tabla 20.** Espesor de las películas de las distintas formulaciones

% HL	Espesor (mm)
0	0,17 ± 0,03 <sup>a</sup>
1	0,16 ± 0,03 <sup>b</sup>
10	0,15 ± 0,02 <sup>b</sup>

n=30; Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Determinación del color

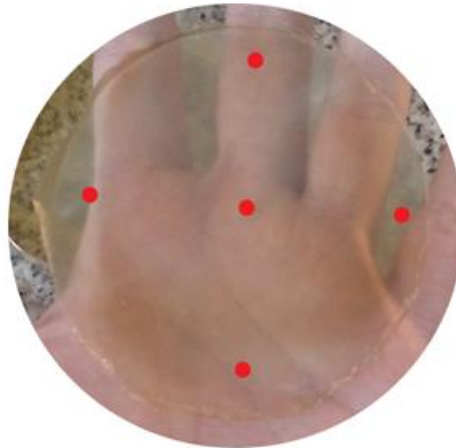
El color de las películas se determinó por el método CIELAB utilizando un colorímetro portátil Konica Minolta modelo CR-400 en 5 puntos diferentes como se muestra en la **Figura 30**. La diferencia total de color ( $\Delta E$ ) producido por el agregado de HL en las películas se determinó mediante la **Ec. 18**:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ec. 18}$$

donde  $\Delta L^*$  es la diferencia entre el valor de  $L^*$  de la muestra con HL y el control;  $\Delta a^*$  es la diferencia entre el valor de  $a^*$  de la muestra con HL y el control y  $\Delta b^*$  es la diferencia entre el valor de  $b^*$  de la muestra con HL y el control.

De acuerdo a Mokrzycki y Tatol (2011), cuando la diferencia total de color se encuentra entre  $0 < \Delta E < 1$ , solo un observador experimentado puede notar la diferencia de color; cuando se encuentra entre  $2 < \Delta E < 3,5$  un observador no experimentado también puede notar dicha diferencia, en cambio si la diferencia de color se encuentra entre  $3,5 < \Delta E < 5$ , se puede observar una clara diferencia de color y cuando  $\Delta E > 5$ , el observador detecta dos colores distintos.

**Figura 30.** Zonas de la película en las que se evaluó el color



Los resultados obtenidos de la medición del color de las películas se muestran en la **Tabla 21**. Se puede observar que el agregado de un 10% de HL en las películas provocó un aumento en el parámetro  $L^*$  (en contraposición a los resultados esperados) y una disminución en los valores de  $a^*$  indicando una tendencia al verde en las películas. Los valores de  $b^*$  se mantuvieron constantes, independientemente del nivel de agregado de HL. Los valores del cambio de color  $\Delta E$  señalaron que existen diferencias significativas en el color de las películas formuladas con HL al 1 y 10 %, pero el cambio de color solo fue evidente al ojo humano para la formulación con 10% de HL ( $\Delta E > 5$ ).

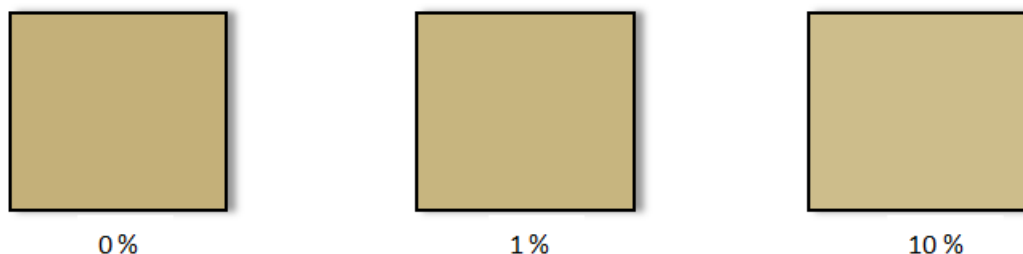
**Tabla 21.** Parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  y  $\Delta E$  expresados en coordenadas del espacio colorimétrico CIELAB

% HL	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$
0	$72,58 \pm 1,28^a$	$1,50 \pm 0,43^a$	$30,76 \pm 1,66^a$	-
1	$74,19 \pm 1,27^{ab}$	$1,04 \pm 0,50^{ab}$	$29,70 \pm 1,66^a$	$2,07 \pm 0,89^a$
10	$77,06 \pm 3,62^b$	$0,19 \pm 1,09^b$	$27,68 \pm 5,97^a$	$9,87 \pm 2,55^b$

$n=5$ ; Para cada columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

A modo de ejemplo, en la **Figura 31** se puede observar el color de las películas de las distintas formulaciones determinado por programas informáticos (Nix, 2021).

**Figura 31.** Comparación del color y aspecto visual de las películas de diferentes formulaciones



#### Evaluación de las propiedades mecánicas

Se evaluaron las propiedades mecánicas de las PPCL-HL a partir de cada una de las 6 probetas (50x10mm) obtenidas para cada formulación, como se describió anteriormente. Para esto, las probetas (**Figura 32**) se colocaron en la máquina de tracción con un espacio entre mordazas de 2.5 mm. El ensayo se realizó a 5 mm/min con una celda de carga de 30 kgf.

**Figura 32.** Probetas utilizadas en la evaluación de las propiedades mecánicas



Los resultados obtenidos luego de su evaluación (**Tabla 22**) demostraron que las películas formuladas con HL al 10% presentan diferencias significativas en los parámetros de  $M_T$  y E con respecto a las muestras control y con HL al 1%, siendo dichos valores más altos en las películas con un 10% de HL, conduciendo a películas más rígidas y resistentes a la rotura. Este último es un aspecto deseado en la elaboración de envases debido a que preserva la integridad de la película durante el procesamiento y manipulación como se mencionó con anterioridad. El aumento de la rigidez y la resistencia a la rotura podría deberse a que podría existir algún mecanismo de entrecruzamiento entre el HL y los componentes de la matriz de levadura, principalmente las proteínas, como se demostró en otros trabajos ya mencionados (Wang y col., 2016 b).

Por el contrario, no se observaron diferencias en el parámetro %e, indicando que un aumento en la concentración de HL en la formulación de las mismas de hasta un 10 % no generan cambios en las propiedades de elongación.



**Tabla 22.** Propiedades mecánicas de las películas formuladas con distintas concentraciones de HL

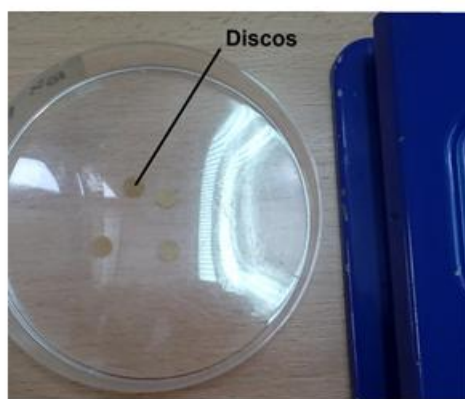
% HL	M <sub>T</sub> (MPa)	% e	E (MPa)
0	0,98 ± 0,16 <sup>a</sup>	26,76 ± 4,15 <sup>a</sup>	8,54 ± 1,17 <sup>a</sup>
1	1,05 ± 0,13 <sup>a</sup>	31,05 ± 5,05 <sup>a</sup>	8,29 ± 1,17 <sup>a</sup>
10	1,33 ± 0,29 <sup>b</sup>	32,11 ± 4,03 <sup>a</sup>	10,35 ± 1,65 <sup>b</sup>

n=6; Para cada columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

### Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo ABTS

Para la determinación de la capacidad antioxidante de las películas, se cortaron discos para cada muestra (**Figura 33**) y se registró en balanza el peso de los mismos de aproximadamente 10 mg. Posteriormente, los discos fueron colocados en tubos eppendorf rotulados con los tiempos a evaluar (1, 5, 10, 15 y 30 min).

**Figura 33.** Discos de películas utilizados para el ensayo de ABTS



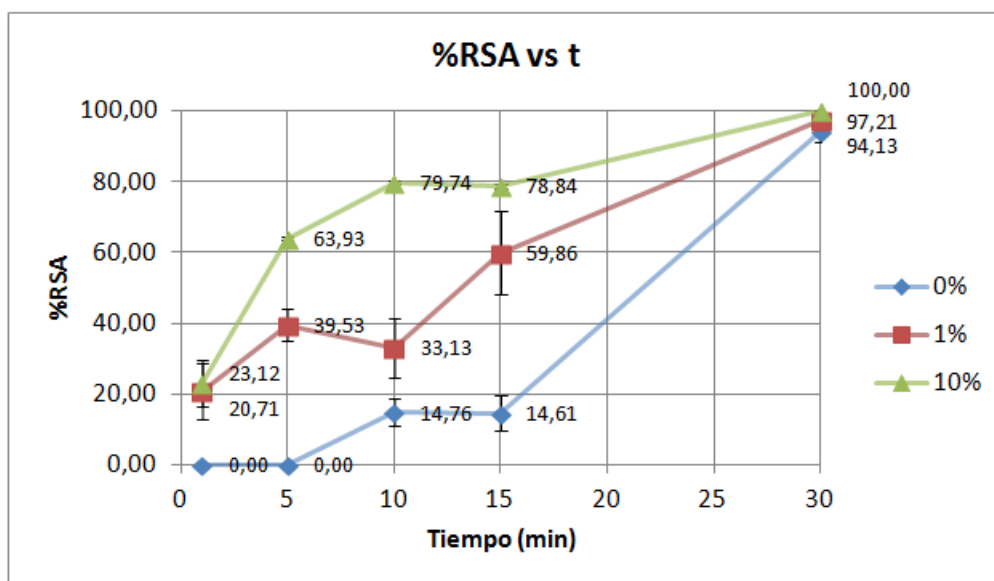
En este caso, la solución B de ABTS se preparó en etanol en lugar de agua MilliQ, es decir se mezcló 1 mL de solución A en 80 mL de etanol 95%. Se agregó 1ml de solución etanólica B de ABTS<sup>•+</sup> a los tubos eppendorf conteniendo los discos de las películas, los mismos se resguardaron de la luz y pasado el tiempo correspondiente se midió la absorbancia a 734 nm. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad antiradicalaria (%RSA) calculados de la siguiente manera (**Ec. 19**):

$$\%RSA = \frac{(Abs_b^{734} - Abs_M^{734})}{Abs_b^{734}} \times 100 \quad \text{Ec. 19}$$

donde la  $Abs_b^{734}$  y la  $Abs_M^{734}$  es la absorbancia del blanco y la muestra respectivamente medidos a 734 nm. Como blanco para cada ensayo se utilizó una solución de ABTS<sup>•+</sup> preparada en etanol alcanzando un valor de 0,664. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Los resultados presentados en la **Figura 34** señalaron que todas las muestras alcanzaron valores cercanos al 100% de RSA luego de 30 min, indicando que tanto las películas formuladas con HL y las que no, presentaron actividad antioxidante apreciable. Este comportamiento puede atribuirse a que los componentes de la pared celular de levadura, como proteínas o  $\beta$ -glucanos, también pueden reaccionar con el  $ABTS^{•+}$  durante el ensayo (Rezzani, 2018; Choque y col. 2021). Debido a ello, cuanto mayor es el tiempo de contacto entre las películas y el  $ABTS^{•+}$ , mayores son los valores alcanzados de %RSA.

**Figura 34.** Actividad antirradicalaria en función del tiempo



Sin embargo, la comparación de los resultados hasta los 15 min de reacción conduce a un análisis de mayor fiabilidad y seguridad. De este modo, las gráficas de %RSA muestran que a dicho tiempo, las películas formuladas con HL exhiben considerablemente mayor actividad antioxidante que las películas sin HL. Por otro parte, las películas con HL al 10% manifestaron valores de %RSA mayores que las de 1 %;  $78,84 \pm 0,75$  y  $59,86 \pm 11,82$ , respectivamente. Esto último confirma la posibilidad de utilizar HL refinado como compuesto activo en películas biodegradables.

## 5. Conclusiones

El HL es un compuesto natural que presenta una gran versatilidad de aplicaciones según su grado de refinamiento, con gran capacidad antioxidante y antimicrobiana comprobada, lo que lo convierte en un aditivo interesante para su aplicación como componente activo en películas en contacto con alimentos;

Las nuevas tecnologías de refinado de HL reducen considerablemente su olor, sabor y color. Esto lo convierte en una alternativa prometedora respecto a otros compuestos naturales con las mismas propiedades activas, como por ejemplo los aceites esenciales;

El estudio del uso de HL en películas biodegradables como sistema activo con aplicación en alimentos es reducido respecto a otros compuestos naturales;

Es posible utilizar HL refinado como agente antioxidante en la elaboración de películas biodegradables a base de pared celular de levadura para el desarrollo de envases activos:

- El HL refinado utilizado en la elaboración de las PPCL-HL presenta actividad antioxidante moderada en comparación con otros antioxidantes naturales;
- Las PPCL-HL obtenidas fueron translúcidas, de color amarillento y sin grietas;
- El color de las películas se vio modificado significativamente con el agregado de un 10% de HL a las PPCL-HL respecto al control, mostrando una mayor luminosidad y una tendencia hacia el verde.
- El agregado de un 10% de HL modificó las propiedades mecánicas de las películas con valores de  $M_T$  y E mayores respecto a las otras formulaciones, mostrando una mayor resistencia. Mientras que la elongación a la ruptura (e%) no se vio afectado por el agregado de HL;
- Las PPCL-HL formuladas con HL exhibieron mayor actividad antioxidante que las sin HL. La incorporación de un 10% de HL presentó un mayor efecto.

## 6. Bibliografía

Acevedo, A. M., Castañeda, M. L., Blanco, K. M., Cardenas, C. Y., Reyes, J. A., Kouznetsov, V. V., & Stashenko, E. E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*, 13(33), 125-128.

Aguilar, P. (2017).

<http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/MicroBiol/1510097815.pdf>

Aguilar-Uscanga, B., & Francois, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in applied microbiology*, 37(3), 268-274.

Agustinelli, S. P. (2014). *Estudio del proceso de ahumado frío de filetes de caballa (Scomber japonicus)* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Agudo, A. (2009). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP): Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. UGT Comisión Ejecutiva Confederal.

Aguilar, M. (2020). <https://tecnologiaconmario.wordpress.com/2020/09/16/kerry-recomienda-humo-liquido-tecnologia-a-favor-de-las-carnes/>

Al-Hassan, A. A., & Norziah, M. H. (2012). Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food hydrocolloids*, 26(1), 108-117.

Álvarez, M. F. (2000). Revisión: Envasado activo de los alimentos/Review: Active food packaging. *Food Science and Technology International*, 6(2), 97-108.

Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and sensorial impacts of oregano and rosemary essential oils over broccoli florets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(3), e13889.

Alvarez, P., Sampedro, M., Molina, M., & Nombela, C. (1994). A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity. *Journal of biotechnology*, 38(1), 81-88.

Anbinder, P. S. (2011). Caracterización, evaluación y aplicaciones de películas poliméricas activas (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

ANMAT (2011).

[http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_Vol\\_I.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf)

Anwar, M. I., Muhammad, F., Awais, M. M., & Akhtar, M. (2017). A review of  $\beta$ -glucans as a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 73(3), 651-661.

Armstrong, E. V., & Deischer, C. K. (1942). Johann Rudolph Glauber (1604-70). His chemical and human philosophy. *Journal of chemical education*, 19(1), 3.

Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., del Carmen Garrigós, M., & Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 486-494.

Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., López, J., del Carmen Garrigós, M., Valente, A. J., & Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 121, 94-101.

Apodaca Mendoza, J. F., & Castañeda Palafox, J. J. (2012). Estabilidad oxidativa de aceite de pescado por catequina incorporada en película compatibilizada de polietileno de baja densidad.

Araujo, C. F. (2019). Efecto antimicrobiano de aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgare*) individuales y en combinación contra *Salmonella Typhimurium*.

ASTM International, ASTM D882: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, ASTM Stand., 2012, 12 P.

Aulacio, M. P. (2002). Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma). [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacologia/catedraMicro/10\\_Antiobio\\_grama.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacologia/catedraMicro/10_Antiobio_grama.pdf)

Autino, J. C., Romanelli, G., y Ruiz, D. M. (2013). Introducción a la Química Orgánica.pdf. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/31664>

Avendaño-Romero, G., López-Malo, A., & Paolu, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 87-96.

Azuero, A., & Troncoso, A. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Revista de Ciencia y Tecnología de alimentos*, 26(2), 25-26.

Badanai, J., Silva, C., Martins, D., Antunes, D., & Miguel, M. G. (2015). Ability of scavenging free radicals and preventing lipid peroxidation of some phenols and ascorbic acid. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(8), 34-41.

Balau, L., Lisa, G., Popa, M. I., Tura, V., & Melnig, V. (2004). Physico-chemical properties of chitosan films. *Central European Journal of Chemistry*, 2(4), 638-647.

Baratta, M. T., Dorman, H. D., Deans, S. G., Biondi, D. M., & Ruberto, G. (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 10(6), 618-627.

Barnes, K., Sinclair, R., & Watson, D. (Eds.). (2006). *Chemical migration and food contact materials*. Woodhead publishing.

Basmatic. (2018). <https://basmatic.com/es-humo-liquido-como-usa-cocina#> (visitado el 23/04/21).

Bertuzzi, M. A., Vidaurre, E. C., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of food engineering*, 80(3), 972-978.

Bishop, J. R. P., Nelson, G., & Lamb, J. (1998). Microencapsulation in yeast cells. *Journal of microencapsulation*, 15(6), 761-773.

Blahovec, J., Hejlová, A., Čopíková, J., & Novák, M. (2011). Tensile properties of microbial  $\beta$ -glucan films. *Polymer Engineering & Science*, 51(12), 2564-2570.

Bodbodak, S., & Rafiee, Z. (2016). Recent trends in active packaging in fruits and vegetables. In *Eco-friendly technology for postharvest produce quality* (pp. 77-125). Academic Press.

Bof, M. J., Bordagaray, V. C., Locaso, D. E., & García, M. A. (2015). Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food hydrocolloids*, 51, 281-294.

Brydson, J. A. (1999). *Plastics materials*. Elsevier.

Burns, D. T. (2014). Important Figures in Analytical Chemistry from Germany: From the Middle Ages to the Nineteenth Century. In *Important Figures of Analytical Chemistry from Germany in Brief Biographies* (pp. 11-47). Springer, Cham.

Campos Campos, C. W. (2017). Estudio de migración de distintos componentes de materiales plásticos a los alimentos. Repositorio Institucional. Universidad Nacional de San Martín.

Cañón, G. P., Moreno, F. I. D., & Bautista, R. G. (2017). Envases activos para productos alimentarios: estudio de los sistemas autocalentables.

Carvajal Buenahora, M. F., & González Barragán, E. A. (2014). Comparación de los módulos de elasticidad de concreto normal, con el ensayo de compresión y el ensayo de flexión.

Caprioli, G., Lupidi, G., & Maggi, F. (2019). Comparison of chemical composition and antioxidant activities of two Winter savory subspecies (*Satureja montana* subsp. *variegata* and *Satureja montana* subsp. *montana*) cultivated in Northern Italy. *Natural product research*, 33(21), 3143-3147.

Catalá, R. (2010). [http://benasque.org/2010fronterastalim/talks\\_contr/063Envasado\\_activo-Benasque-alumnos.pdf](http://benasque.org/2010fronterastalim/talks_contr/063Envasado_activo-Benasque-alumnos.pdf)

Ccopa Mamani, L. (2014). Evaluación de la conservación de filetes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) envasada con películas biodegradables con la adición de aceite esencial de muña (*Mintostachys mollis*).

Cercenadoa, E., & Saavedra-Lozanob, J. (2009). El antibiograma.

Chan, G. C. F., Chan, W. K., & Sze, D. M. Y. (2009). The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of hematology & oncology*, 2(1), 1-11.

Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.

Choque, E., Rezzani, G., Salvay, A. G., Mathieu, F., & Peltzer, M. A. (2021). Impact of Fungal Extracts on the Physical and Antioxidant Properties of Bioactive Films Based on Enzymatically Hydrolyzed Yeast Cell Wall. *Journal of Polymers and the Environment*, 29(6), 1954-1962.

Ciannamea, E. M., Stefani, P. M., & Ruseckaite, R. A. (2014). Physical and mechanical properties of compression molded and solution casting soybean protein concentrate based films. *Food Hydrocolloids*, 38, 193-204.

Ciannamea, E. M., Stefani, P. M., & Ruseckaite, R. A. (2015). Storage-induced changes in functional properties of glycerol plasticized- soybean protein concentrate films produced by casting. *Food hydrocolloids*, 45, 247-255.

Código Alimentario Argentino (C.A.A). Capítulo IV: Utensilios, recipientes, envases, envolturas, aparatos y accesorios, Res GMC N° 003/92: Criterios generales de envases y equipamientos alimentarios en contacto con alimentos.

Código Alimentario Argentino (C.A.A). Capítulo IV: Utensilios, recipientes, envases, envolturas, aparatos y accesorios, Res GMC N° 056/92: Disposiciones generales para envases y equipamientos plásticos en contacto con alimentos.

Código Alimentario Argentino (C.A.A). Capítulo XVIII: Aditivos alimentarios, Res GMC N° 083/93.

Código Alimentario Argentino (C.A.A). Capítulo IV: Utensilios, recipientes, envases, envolturas, aparatos y accesorios, Res GMC N° 32/10: Reglamento técnico Mercosur sobre migración en materiales, envases y equipamientos plásticos destinados a estar en contacto con alimentos.

Código Alimentario Argentino (C.A.A). Capítulo IV: Utensilios, recipientes, envases, envolturas, aparatos y accesorios, Res GMC N° 40/15: Reglamento técnico Mercosur sobre materiales, envases y equipamientos celulósicos destinados a estar en contacto con alimentos.

Código Alimentario Argentino (C.A.A). Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos, MERCOSUR/GMC/Resolución n° 26/03: Reglamento técnico MERCOSUR para la rotulación de alimentos envasados.

Código Alimentario Argentino (C.A.A). Capítulo XVIII: Aditivos alimentarios, Res GMC N° 10/06: Reglamento técnico Mercosur sobre aditivos aromatizantes/saborizantes.

Código Alimentario Argentino (C.A.A). Capítulo XVIII: Aditivos alimentarios, Resolución GMC N° 105/94: Principio de transferencia de aditivos alimentarios.

Comisión Europea (CE): Reglamento (CE) n° 450/2009 de la Comisión, de 29 de mayo de 2009, sobre los materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos.

Comisión Europea (CE): Reglamento (CE) n° 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.

Conde, L. (2018). <https://www.lavanguardia.com/comer/materiaprima/20180105/434058549985/sabor-ahumado.html> (visitado el 29/04/21).

Cordón, B. A. (2017). Efecto de la temperatura y tipo de simulante alimentario en la migración de ftalatos en cuatro películas auto-adheribles para envase de alimentos.

Crank, J. (1979). *The mathematics of diffusion*. Oxford university press.

Cyras, V. P., Commisso, M. S., Mauri, A. N., & Vázquez, A. (2007). Biodegradable double-layer films based on biological resources: Polyhydroxybutyrate and cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 106(2), 749-756.

Daniau, A. L., d'Errico, F., & Goñi, M. F. S. (2010). Testing the hypothesis of fire use for ecosystem management by Neanderthal and Upper Palaeolithic modern human populations. *Plos one*, 5(2), e9157.

Dardelle, G., Normand, V., Steenhoudt, M., Bouquerand, P. E., Chevalier, M., & Baumgartner, P. (2007). Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 953-960.

Davidson, P. M., & Branden, A. L. (1981). Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. *Journal of Food Protection*, 44(8), 623-632.

Davis, S. C., & Perez, R. (2009). Cosmeceuticals and natural products: wound healing. *Clinics in dermatology*, 27(5), 502-506.

Day, B. P. (2003). Active packaging. *Food packaging technology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. p, 282-302.

De Abreu, D. P., Losada, P. P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43(5), 1277-1282.

Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Salvay, A. G., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2018) a. Characterization of thermal, mechanical and hydration properties of novel films based on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Innovative food science & emerging technologies*, 48, 240-247.

Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Wagner, J. R., & Salvay, A. G. (2018) b. Hydration and water vapour transport properties in yeast biomass based films: A study of plasticizer content and thickness effects. *European Polymer Journal*, 99, 9-17.

Delgado, J. F., Sceni, P., Peltzer, M. A., Salvay, A. G., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2016). Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 83-91.

Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, A. N., & Gomez-Guillen, M. C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2094-2101.

Desvita, H., Faisal, M., Mahidin, M., & Suhendrayatna, S. (2021, March). Preliminary study on the antibacterial activity of liquid smoke from cacao pod shells (*Theobroma cacao* L). In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 1098, No. 2, p. 022004). IOP Publishing.

D'hondt, E., Martin-Juarez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K. & Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts* (pp. 133-154). Woodhead Publishing.

Díaz, R. G. (2014). Envasado activo de alimentos. El paradigma de la innovación. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, (27), 35-47.

Dicastillo, C. L., Bustos, F., Guarda, A., & Galotto, M. J. (2016). Cross-linked methyl cellulose films with murta fruit extract for antioxidant and antimicrobial active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 60, 335-344.

Dien, H. A., Montolalu, R. I., & Berhimpon, S. (2019, May). Liquid smoke inhibits growth of pathogenic and histamine forming bacteria on skipjack fillets. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 278, No. 1, p. 012018). IOP Publishing

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2016). Grupo InfoStat, FCA. *Universidad Nacional de Córdoba Argentina*. [<http://www.infostat.com.ar>] Accessed June.

Dopico-Garcia, M. S., Lopez-Vilarino, J. M., & González-Rodríguez, M. V. (2003). Determination of antioxidant migration levels from low-density polyethylene films into food simulants. *Journal of chromatography A*, 1018(1), 53-62.



- Ele. (2019). <https://www.ele-mix.com/news/working-principle-of-bead-mill-24426552.html>
- Elizari Reta, I. (2013). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de orégano y tomillo incorporados en soluciones formadoras de films sobre la microbiota superficial de filetes de merluza.
- El-Naggar, M. A., & Thabit, T. M. (2014). Evaluation of  $\beta$ -d-glucan biopolymer as a novel mycotoxin binder for fumonisin and deoxynivalenol in soybean feed. *Foodborne pathogens and disease*, 11(6), 433-438.
- Escobar, D., Sala, A., Silvera, C., Harsipe, R., & Márquez, R. (2009). Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador. *INNOTEC*, (4 ene-dic), 33-36.
- Estacho, P. V. (2013). *Estudio de adhesivos en envase alimentario: desarrollo de métodos de análisis, difusión y migración de sus componentes a los alimentos envasados* (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza).
- Estrada-Muñoz, R., Boyle, E. A. E., & Marsden, J. L. (1998). Liquid smoke effects on Escherichia coli O157: H7, and its antioxidant properties in beef products. *Journal of food science*, 63(1), 150-153.
- Fabra, P. (2020). Envases activos e inteligentes.
- FAO (2001). Smoke flavourings prepared at the 57th JECFA (2001) and published in FNP 52 Add. 9 (2001), superseding tentative specifications prepared at the 55th JECFA (2000) and published in FNP 52 Add. 8 (2000). An ADI of "Provisional acceptance" was established at the 31st JECFA (1987).
- Fathanah, U., Lubis, M. R., Nasution, F., & Masyawi, M. S. (2018, March). Characterization of bioplastic based from cassava crisp home industrial waste incorporated with chitosan and liquid smoke. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 334, No. 1, p. 012073). IOP Publishing.
- Fernando, J., & Duque, S. (2014). Alginato de sodio en el desarrollo de películas comestibles. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5(2), 089-113.
- Ferrero, C., Muñoz-Ruiz, A., & Jiménez-Castellanos, M. R. (2000). Fronts movement as a useful tool for hydrophilic matrix release mechanism elucidation. *International Journal of Pharmaceutics*, 202(1-2), 21-28.
- Foti, M. C. (2007). Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1673-1685.
- Fraise, A. P., Wilkinson, M. A. C., Bradley, C. R., Oppenheim, B., & Moiemmen, N. (2013). The antibacterial activity and stability of acetic acid. *Journal of Hospital Infection*, 84(4), 329-331.
- Franca, A. A., y Luiz, C. A. A. (2019). <https://www.duasrodas.com/es/sabores-de-humo-conservacion-de-alimentos-con-toque-gourmet/> (visitado el 23/04/2021).
- Franco, F. M. I. (2011). Estudios de la difusión de catequina y epicatequina en películas de ácido poliláctico y su caracterización fisicoquímica.

Freimund, S., Sauter, M., Käppeli, O., & Dutler, H. (2003). A new non-degrading isolation process for 1, 3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, 54(2), 159-171.

Gaikwad, K. K., Singh, S., & Negi, Y. S. (2020). Ethylene scavengers for active packaging of fresh food produce. *Environmental Chemistry Letters*, 18(2), 269-284.

Galán, A. (2016). <https://elblogdelaseguridadcontraincendios.es/conoces-las-diferencias-entre-el-smouldering-y-la-combustion-con-llamas/> (visitado el 15/05/21).

Gao, C., Stading, M., Wellner, N., Parker, M. L., Noel, T. R., Mills, E. C., & Belton, P. S. (2006). Plasticization of a protein-based film by glycerol: a spectroscopic, mechanical, and thermal study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(13), 4611-4616.

García, Y. G., Contreras, J. C. M., Reynoso, O. G., & López, J. A. C. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77-115.

Gende, L. B., Neira Hazime, L. M., Alvarez, B. S., Eguaras, M. J., Ruseckaite, R. A., & Martucci, J. F. (2013). Películas activas para el envasado de alimentos.

Ghosh, T. K., Haldar, S., Bedford, M. R., Muthusami, N., & Samanta, I. (2012). Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(2), 275-284.

Gomaa, E. A., Gray, J. I., Rabie, S., Lopez- Bote, C., & Booren, A. M. (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. *Food Additives & Contaminants*, 10(5), 503-521.

Granda-Restrepo, D. M., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Troncoso-Rojas, R., Vallejo-Córdoba, B., Gámez-Meza, N., & Graciano-Verdugo, A. Z. (2009). Migration of  $\alpha$ -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food research international*, 42(10), 1396-1402.

Grand View Research. (2019). <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/liquid-smoke-market> (visitado el 28/04/21).

Guillén, M. D., & Cabo, N. (2004). Study of the effects of smoke flavourings on the oxidative stability of the lipids of pork adipose tissue by means of Fourier transform infrared spectroscopy. *Meat science*, 66(3), 647-657.

Guillén, M. D., & Ibargoitia, M. L. (1998). New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1276-1285.

Guillén, M. D., & Manzanos, M. J. (1999). Smoke and liquid smoke. Study of an aqueous smoke flavouring from the aromatic plant *Thymus vulgaris* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(10), 1267-1274.

Gutierrez, L., Escudero, A., Battle, R., & Nerin, C. (2009). Effect of mixed antimicrobial agents and flavors in active packaging films. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8564-8571.

Hamdani, M., Feigenbaum, A., & Vergnaud, J. M. (1997). Prediction of worst case migration from packaging to food using mathematical models. *Food Additives & Contaminants*, 14(5), 499-506.

- Han, J. H. (2014). Edible films and coatings: a review. *Innovations in food packaging*, 213-255.
- Harris, K. D. (2015). Red Arrow products smokin'into the future: Facing changing diets and new challenges in the food industry. *International Food and agribusiness management review*, 18 (1030-2016-83080), 223-237.
- Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International journal of biological macromolecules*, 109, 1095-1107.
- Hejlova, A., & Blahovec, J. (2015). Stress relaxation and activation volume in tension in  $\beta$ -glucan and chitosan films. *Polymer Engineering & Science*, 55(3), 624-633.
- Helmroth, E., Rijk, R., Dekker, M., & Jongen, W. (2002). Predictive modelling of migration from packaging materials into food products for regulatory purposes. *Trends in Food Science & Technology*, 13(3), 102-109.
- Hernández, E., López, A., & Esnoz, A. (2014). Modelización y optimización de sistemas de autoenfriamiento de envases alimentarios por adsorción a vacío. In *Actas del III Workshop en Investigación Agroalimentaria*.
- Hernández Silva, M. L., & Guzmán Martínez, B. (2009). Biopolymers used in the manufacture of food packaging.
- Holzschuh, P., Buch, G., & Weiland, J. J. (2010). *U.S. Patent No. 7,758,907*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Hu, G., Chen, J., & Gao, J. (2009). Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 291-298.
- Huber, K. C., & Embuscado, M. (2009). Applications edible films and coatings for food.
- Huet Breña, C. (2017). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas.
- In, Y. W., Kim, J. J., Kim, H. J., & Oh, S. W. (2013). Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against *S. higella* species. *Journal of Food Safety*, 33(1), 79-85.
- Jost, V., & Stramm, C. (2016). Influence of plasticizers on the mechanical and barrier properties of cast biopolymer films. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2).
- Juárez Mendez, M. E. (2019). Influencia del tipo de solvente y la concentración del extracto de *Melicoccus bijugatus* sobre películas antimicrobianas de quitosano-almidón.
- Junaidi, A. B., & Nursyifa, A. (2020, December). Redistillation and characterization of liquid smoke from ulin wood (*Eusideroxylon zwageri* Teijsm. & Binn.) and its ability as a chitosan solvent. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 980, No. 1, p. 012024). IOP Publishing.
- Kailaku, S. I., Syakir, M., Mulyawanti, I., & Syah, A. N. A. (2017, June). Antimicrobial activity of coconut shell liquid smoke. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 206, No. 1, p. 012050). IOP Publishing.
- Katan, L. L. (Ed.). (1996). *Migration from food contact materials*. place unknown: Blackie Academic & Professional.

Kjällstrand, J., & Petersson, G. (2001) a. Phenolic antioxidants in alder smoke during industrial meat curing. *Food Chemistry*, 74(1), 85-89.

Kjällstrand, J., & Petersson, G. (2001) b. Phenolic antioxidants in wood smoke. *Science of the Total Environment*, 277(1-3), 69-75.

Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International journal of pharmaceutics*, 15(1), 25-35.

Kunte, L. A., Gennadios, A., Cuppett, S. L., Hanna, M. A., & Weller, C. L. (1997). Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, 74(2), 115-118.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Ciência and Technology*, 25 (4): 726–732.

Krochta, J. M. (2017). Edible protein films and coatings. *Food proteins and their applications*, 529-550.

Lagos Narváez, J. F. (2017). *Identificación y caracterización de levaduras fermentadoras de cacao (Theobroma cacao) provenientes de centros de acopio de dos localidades del Ecuador* (Bachelor's thesis, PUCE).

Lamarra, J. A. (2019). *Matrices biodegradables como soportes de micro y nanopartículas activas para su aplicación como sistemas de liberación controlada* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/75093>

Lau, O. W., & Wong, S. K. (2000). Contamination in food from packaging material. *Journal of chromatography A*, 882(1-2), 255-270.

Leimer, K. H., & Finguerut, J. (2005). Alternatives for the use of dried yeast and its products. In *Proc. ISSCT* (Vol. 25).

Lillo Reyes, C. B. (2016). Efecto de la adición de manoproteínas comerciales sobre las características físicas, químicas y sensoriales de un vino "Cabernet Sauvignon".

Lingbeck, J. M., Cordero, P., O'Bryan, C. A., Johnson, M. G., Ricke, S. C., & Crandall, P. G. (2014). Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Science*, 97(2), 197-206.

Liu, D., Ding, L., Sun, J., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds—A review. *Innovative food science & emerging technologies*, 36, 181-192.

Llabot, J. M., Manzo, R. H., & Allemandi, D. A. (2004). Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *International journal of pharmaceutics*, 276(1-2), 59-66.

Lombok, J. Z., Setiaji, B., Trisunaryanti, W., & Wijaya, K. (2014). Effect of pyrolysis temperature and distillation on character of coconut shell liquid smoke. *Asian J Sci Technol*, 5(6), 320-5.

López de Dicastillo, C., Nerín, C., Alfaro, P., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2011). Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(14), 7832-7840.

López, D. F., Osorio, O., & Checa, O. E. (2019). Propiedades Mecánicas de un Material de Pectina para Revestimiento de Fibras Naturales Utilizadas en Aplicaciones Agrícolas. *Información tecnológica*, 30(3), 189-198.

López, O. V., & García, M. A. (2012). Starch films from a novel (*Pachyrhizus ahipa*) and conventional sources: development and characterization. *Materials Science and Engineering: C*, 32(7), 1931-1940.

López Pérez, J. P., & Boronat Gil, R. (2013). Estudio de la inhibición de la respiración/fermentación en células de levadura por fluoruro de sodio.

López Ramírez, H. A., & Timote Briñez, A. M. (2017). Macromodelamiento mecánico del diagrama esfuerzo-deformación en un acero AISI 1045 templado desde temperaturas intercríticas.

Maga, J. A. (1987). The flavor chemistry of wood smoke. *Food Reviews International*, 3(1-2), 139-183.

Manals-Cutiño, E., Penedo-Medina, M., & Giralt-Ortega, G. (2011). Análisis termogravimétrico y térmico diferencial de diferentes biomásas vegetales. *Tecnología química*, 31(2), 180-190.

Mani-López, E., García, H. S., & López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713-721.

Mane, K. A. (2016). A review on active packaging: an innovation in food packaging. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 1(3), 238566.

Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., & Gutiérrez, E. (2011). Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, 1, 53-58.

Martinez, O., Salmeron, J., Guillen, M. D., & Casas, C. (2007). Textural and physicochemical changes in salmon (*Salmo salar*) treated with commercial liquid smoke flavourings. *Food Chemistry*, 100(2), 498-503.

Martínez-Tenorio, Y., & López-Malo, V. (2011). Envases activos con agentes antimicrobianos y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*, 5(2), 1-12.

Martucci, J. F., Gende, L. B., Neira, L. M., & Ruseckaite, R. A. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205-213.

Mata-Miranda, M. M., Guerrero-Robles, C. I., Rojas-López, M., Delgado-Macuil, R. J., González-Díaz, C. A., Sánchez-Monroy, V. & Vázquez-Zapién, G. J. (2017). Componentes principales mediante espectroscopia FTIR como técnica de caracterización innovadora durante la diferenciación de células madre pluripotentes a células pancreáticas. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 38(1), 225-234.

Mathlouthi, N., Bouzaienne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M., & Bergaoui, R. (2012). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: in vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *Journal of animal science*, 90(3), 813-823.

Maulina, S. E. R. I., & Sinaga, F. A. F. (2019). The Opportunities of Oil Palm Fronds Become a Commercial Liquid Smoke. In *Materials Science Forum* (Vol. 948, pp. 159-166). Trans Tech Publications Ltd.

Mauri, A. N., & Añón, M. C. (2006). Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(7), 1064-1072.

Mauri, A. N., & Añón, M. C. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. *Food Science and Technology International*, 14(2), 119-125.

McMurry, J. (2008). Química orgánica, 7a.edición. CENGAGE Learning.

Melville, A. (1923).

[https://books.google.com.ar/books?id=O0QEAAAAMBAJ&pg=PA209&lpg=PA209&dq=Unusual+Stories+of+Unusual+Men:+Ernest+H.+Wright,+The+Rotarian&source=bl&ots=lvxdKP5-RP&sig=ACfU3U0F-nhRC82duF9xZto\\_oNKb0zq0rg&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiq3dnD-7fwAhUCqZUCHSwhBBkQ6AEwCnoECAIQAw#v=onepage&q=Unusual%20Stories%20of%20Unusual%20Men%3A%20Ernest%20H.%20Wright%2C%20The%20Rotarian&f=false](https://books.google.com.ar/books?id=O0QEAAAAMBAJ&pg=PA209&lpg=PA209&dq=Unusual+Stories+of+Unusual+Men:+Ernest+H.+Wright,+The+Rotarian&source=bl&ots=lvxdKP5-RP&sig=ACfU3U0F-nhRC82duF9xZto_oNKb0zq0rg&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiq3dnD-7fwAhUCqZUCHSwhBBkQ6AEwCnoECAIQAw#v=onepage&q=Unusual%20Stories%20of%20Unusual%20Men%3A%20Ernest%20H.%20Wright%2C%20The%20Rotarian&f=false) (visitado el 28/04/21).

Middelberg, A. P. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology advances*, 13(3), 491-551.

Milly, P. J. (2003). *Antimicrobial properties of liquid smoke fractions* (Doctoral dissertation, University of Georgia).

Milly, P. J., Toledo, R. T., & Ramakrishnan, S. (2005). Determination of minimum inhibitory concentrations of liquid smoke fractions. *Journal of Food Science*, 70(1), M12-M17.

Mulyawanti, I., Kailaku, S. I., & Syah, A. N. A. (2019, September). Chemical Identification of Coconut Shell Liquid Smoke. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 309, No. 1, p. 012020). IOP Publishing.

Mohan, D., Pittman Jr, C. U., & Steele, P. H. (2006). Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy & fuels*, 20(3), 848-889.

Mokrzycki W. S., & Tatol M. (2011). Color difference  $\Delta E$ : A survey. *Machine Graphics and Vision*, 20(4), 383-411.

Montazeri, N., Oliveira, A. C., Himelbloom, B. H., Leigh, M. B., & Crapo, C. A. (2013) a. Chemical characterization of commercial liquid smoke products. *Food science & nutrition*, 1(1), 102-115.

Montazeri, N., Himelbloom, B. H., Oliveira, A. C., Leigh, M. B., & Crapo, C. A. (2013) b. Refined liquid smoke: a potential antilisterial additive to cold-smoked sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of food protection*, 76(5), 812-819.

Moran, C. A. (2004, May). Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan. In *International Feed Industry Symposium* (Vol. 20, pp. 280-296).

Moreno Villa, F. A. (2010). *Obtención de glucosamina hidrociorada (GlcHCl) a partir de la hidrólisis ácida de quitina y quitosano extraídos de desecho de jaiba (Callinectes arcuatus)* (Master's thesis, Moreno Villa, Flor Angelica).

Nakatani, N. (1992). Natural antioxidants from spices.

Narváez-Araujo, S. A. (2010).

[http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11624/1/45445\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11624/1/45445_1.pdf) (visitado el 26/04/21).

- Navia, D. P., Ayala, A. A., & Villada, H. S. (2014). Interacciones empaque-alimento: migración. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 13(25), 99-113.
- Nieto, S. S. (2013). Material de apoyo para los estudiantes del curso Bioquímica experimental.
- Nikavar, B., Ali, N. A., & Kamalnejhad, M. (2008). Evaluation of the antioxidant properties of five Mentha species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2008), 7 (3): 203-209.
- Nix. (2021). <https://www.nixsensor.com/free-color-converter/>.
- Nguyen, T. H., Fleet, G. H., & Rogers, P. L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(2), 206-212.
- Northcote, D. H., & Horne, R. W. (1952). The chemical composition and structure of the yeast cell wall. *Biochemical Journal*, 51(2), 232.
- Novák, M., Synytsya, A., Gedeon, O., Slepíčka, P., Procházka, V., Synytsya, A., Čopíková, J., Blahovec, J., & Hejlová, A. (2012). Yeast  $\beta$  (1-3),(1-6)-d-glucan films: preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2496-2504.
- Núñez Solís, A. C. (2014). Obtención de una película de bioplástico a partir del colágeno de las patas de pollo.
- Oliva, M. M. R., Quintana, M. P., & Salabarría, R. B. (2008). Componentes de la pared de las levaduras: Actividad probiótica.
- Oramahi, H. A., & Diba, F. (2013). Maximizing the production of liquid smoke from bark of Durio by studying its potential compounds. *Procedia Environmental Sciences*, 17, 60-69.
- Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, 29(2-3), 207-233.
- Otero, M. A., Guerrero, I., Wagner, J. R., Cabello, A. J., Sceni, P., García, R., Soriano, J., Tomasini, A., Saura, G., & Almazán, O. (2011). Las levaduras y sus derivados como ingredientes en la industria de alimentos. *Bioteología Aplicada*, 28(4), 272-275.
- Othman, S. H. (2014). Bio-nanocomposite materials for food packaging applications: types of biopolymer and nano-sized filler. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 296-303.
- Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(3), 185-193.
- Pacheco, J. L. C., Yee, S. K. M., Zentella, M. L., & Marvan, J. E. E. (2019). Celulosa bacteriana en gluconacetobacter xylinum: Biosíntesis y aplicaciones.
- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P. L., & Morelli, I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 39(3), 167-170.
- Paramera, E. I., Konteles, S. J., & Karathanos, V. T. (2011). Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 125(3), 892-902.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- Parzanese, M. (2010). Películas y recubrimientos comestibles. *Tecnologías para la industria Alimentaria*.

Peltzer, M. A., Salvay, A. G., Delgado, J. F., & Wagner, J. R. (2017). Use of edible films and coatings for functional foods developments: A review. *Funct. Foods Sources Health Eff. Future Perspect*, 1-26.

Peltzer, M., Delgado, J. F., Salvay, A. G., & Wagner, J. R. (2018) a.  $\beta$ -Glucan, a promising polysaccharide for bio-based films developments for food contact materials and medical applications. *Current Organic Chemistry*, 22(12), 1249-1254.

Peltzer, M. A., Salvay, A. G., Delgado, J. F., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2018) b. Use of residual yeast cell wall for new biobased materials production: effect of plasticization on film properties. *Food and Bioprocess Technology*, 11(11), 1995-2007.

Pilevar, Z., Hosseini, H., Hajimehdipoor, H., Shahraz, F., Alizadeh, L., Mousavi Khaneghah, A., & Mahmoudzadeh, M. (2017). The anti-Staphylococcus aureus effect of combined Echinophora platyloba essential oil and liquid smoke in beef. *Food technology and biotechnology*, 55(1), 117-124.

Pillet, F., Lemonier, S., Schiavone, M., Formosa, C., Martin-Yken, H., Francois, J. M., & Dague, E. (2014). Uncovering by atomic force microscopy of an original circular structure at the yeast cell surface in response to heat shock. *BMC biology*, 12(1), 1-11.

Pizarro, S., Ronco, A. M., & Gotteland, M. (2014). Beta-glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud?. *Revista chilena de nutrición*, 41(4), 4339-446.

Pöhlmann, M., Hitzel, A., Schwägele, F., Speer, K., & Jira, W. (2013). Influence of different smoke generation methods on the contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in Frankfurter-type sausages. *Food Control*, 34(2), 347-355.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (2001). (Eds.). "Antioxidants in Food Practical Applications 2001". (cap 1). CRC press.

Pollini, M., Russo, M., Licciulli, A., Sannino, A., & Maffezzoli, A. (2009). Characterization of antibacterial silver coated yarns. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(11), 2361-2366.

Pooramini, M., Kamali, A., Hajimoradloo, A., Alizadeh, M., & Ghorbani, R. (2009). Effect of using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as probiotic on growth parameters, survival and carcass quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry. *International Aquatic Research*, 1(1), 39-44.

Prasad, P., & Kochhar, A. (2014). Active packaging in food industry: a review. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(5), 1-7.

Quesada, J., Sendra, E., Navarro, C., & Sayas-Barberá, E. (2016). Antimicrobial active packaging including chitosan films with *Thymus vulgaris* L. essential oil for ready-to-eat meat. *Foods*, 5(3), 57.

Ranga Rao, K. V., Devi, K. P., & Buri, P. (1988). Cellulose matrices for zero-order release of soluble drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 14(15-17), 2299-2320.

Rasooli, I., Rezaei, M. B., & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International journal of infectious diseases*, 10(3), 236-241.



Razzaq, H. A., Pezzuto, M., Santagata, G., Silvestre, C., Cimmino, S., Larsen, N., & Duraccio, D. (2016). Barley  $\beta$ -glucan-protein based bioplastic film with enhanced physicochemical properties for packaging. *Food Hydrocolloids*, 58, 276-283.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans. (1999), C., 26: 1231- 1237.

Ren, X., Yu, D., Yu, L., Gao, G., Han, S., & Feng, Y. (2007). A new study of cell disruption to release recombinant thermostable enzyme from *Escherichia coli* by thermolysis. *Journal of biotechnology*, 129(4), 668-673.

Resa, C. P. O., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2014). Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control*, 44, 146-151.

Retegi, A., Gabilondo, N., Pena, C., Zuluaga, R., Castro, C., Ganan, P., De la Caba, K. & Mondragon, I. (2010). Bacterial cellulose films with controlled microstructure–mechanical property relationships. *Cellulose*, 17(3), 661-669.

Revista Alimentos. (2015). <https://www.revistalimentos.com/ediciones/edicion-29/humoliquido-en-embutidos/> (visitado el 23/04/21).

Rezzani, G., D. (2018). Desarrollo de materiales bioactivos en base a pared celular de levadura y compuestos antioxidantes de origen fúngico (Trabajo Final de Carrera de Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional de Quilmes. <https://biblio.unq.edu.ar/Record/30797>

Ribeiro-Santos, R., de Melo, N. R., Andrade, M., & Sanches-Silva, A. (2017). Potential of migration of active compounds from protein-based films with essential oils to a food and a food simulant. *Packaging Technology and Science*, 30(12), 791-798.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.

Riches, D. (2020). <https://www.thespruceeats.com/liquid-smoke-overview-335486> (visitado el 28/04/2021).

Rinaudo, M. (2014). Biomateriales basados en un polisacárido natural: el alginato. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 17(1), 92-96.

Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of controlled release*, 5(1), 37-42.

Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2012). Heat treatment to modify the structural and physical properties of chitosan-based films. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(1), 492-499.

Rodrigues, A. C. P., Nardi, R. M., Bambilra, E. A., Vieira, E. C., & Nicoli, J. R. (1996). Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(3), 251-256.

Rodríguez-Sauceda, R., Rojo-Martínez, G. E., Martínez-Ruiz, R., Piña-Ruiz, H. H., Ramírez-Valverde, B., Vaquera-Huerta, H., & Cong-Hermida, M. D. L. C. (2014). Envases inteligentes para la conservación de alimentos. *Ra Ximhai*, 10(6), 151-173.

Romano, N. G., Tavera Quiroz, M. J., Bértola, N. C., Mobili, P., Pinotti, A. N., & Gómez-Zavaglia, A. (2016). Preservación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus plantarum* en películas biodegradables de metilcelulosa. In *III International Conference on Food Innovation (FoodInnova)(Concordia, Entre Ríos, 20 al 23 de octubre de 2014)*.

Saloko, S., Darmadji, P., Setiaji, B., & Pranoto, Y. (2014). Antioxidative and antimicrobial activities of liquid smoke nanocapsules using chitosan and maltodextrin and its application on tuna fish preservation. *Food Bioscience*, 7, 71-79.

Sánchez Aldana, D., Contreras-Esquivel, J. C., Nevárez-Moorillón, G. V., & Aguilar, C. N. (2015). Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón Mexicano. *CyTA-Journal of Food*, 13(1), 17-25.

Sanchez Irigoien, J. C. (2017). Efectos toxicológicos del humo en ahumado de queso provolone.

Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., & Machová, E. (1999). Microbial (1→3)-β-d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate polymers*, 38(3), 247-253.

Santiago Santiago, M. (2015). Elaboración y caracterización de películas biodegradables obtenidas con almidón nanoestructurado.

Santos, S., Carbajo, J. M., & Villar, J. C. (2015). Celulosa Bacteriana.

Sceni, P. (2021). Ingredientes multicomponentes a partir de levadura. Estudio de sus propiedades interfaciales y su aplicación en alimentos.

Sceni, P., Palazolo, G. G., del Carmen Vasallo, M., Puppo, M. C., Otero, M. A., & Wagner, J. R. (2009). Thermal and surface behavior of yeast protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1098-1106.

Sen-Utsukarci, B., Taskin, T., Goger, F., Tabanca, N., Estep, A. S., Kessler, S. M., Akbal-Dagistan, O., Bardakci, H., Kurkcuoglu, M., Becnel, J., Kiemer, A., & Mat, A. (2019). Chemical composition and antioxidant, cytotoxic, and insecticidal potential of *Valeriana alliariifolia* in Turkey. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 70(3), 207-218.

Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. Critical reviews in food science & nutrition, 32(1), 67-103.

Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2020). Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 128403.

Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S. M., & Khaksar, R. (2014). Characterization of κ-carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. *Carbohydrate polymers*, 101, 582-591.

Simon, R., de la Calle, B., Palme, S., Meier, D., & Anklam, E. (2005). Composition and analysis of liquid smoke flavouring primary products. *Journal of Separation Science*, 28(9-10), 871-882.

Soares, J. M., da Silva, P. F., Puton, B. M. S., Brustolin, A. P., Cansian, R. L., Dallago, R. M., & Valduga, E. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of liquid smoke and its potential application to bacon. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 189-197.

Soazo, M., Pérez, L. M., Piccirilli, G. N., Delorenzi, N. J., & Verdini, R. A. (2016). Antimicrobial and physicochemical characterization of whey protein concentrate edible films incorporated with liquid smoke. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 285-291.

Solano, A. C. V., & Valderrama Solano, A. C. (2008). Desarrollo de envases activos tipo película mediante el estudio de dos diferentes métodos de incorporación de extractos naturales en un polímero plástico.

Soldera, S., Sebastianutto, N., & Bortolomeazzi, R. (2008). Composition of phenolic compounds and antioxidant activity of commercial aqueous smoke flavorings. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(8), 2727-2734

Song, J. H., Murphy, R. J., Narayan, R., & Davies, G. B. H. (2009). Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences*, 364(1526), 2127-2139.

Soto-Cantú, C. D., Graciano-Verdugo, A. Z., Peralta, E., Islas-Rubio, A. R., González-Córdova, A., González-León, A., & Soto-Valdez, H. (2008). Release of butylated hydroxytoluene from an active film packaging to asadero cheese and its effect on oxidation and odor stability. *Journal of dairy science*, 91(1), 11-19.

Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 20-28.

Suñen, E. (1998). Minimum inhibitory concentration of smoke wood extracts against spoilage and pathogenic micro-organisms associated with foods. *Letters in Applied Microbiology*, 27(1), 45-48.

Suñen, E., Fernandez-Galian, B., & Aristimuño, C. (2001). Antibacterial activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* at low temperature. *Food microbiology*, 18(4), 387-393

Swastawati, F., Agustini, T. W., Darmanto, Y. S., & Dewi, E. N. (2007). Liquid smoke performance of lamtoro wood and corn cob. *Journal of Coastal Development*, 10(3), 189-196

Tanada-Palmu, P. S., & Grosso, C. R. (2003). Development and characterization of edible films based on gluten from semi-hard and soft Brazilian wheat flours (development of films based on gluten from wheat flours). *Food Science and Technology*, 23(2), 264-269.

Tehrany, E. A., & Desobry, S. (2004). Partition coefficients in food/packaging systems: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21(12), 1186-1202.

Thammakiti, S., Suphantharika, M., Phaesuwan, T., & Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry. *International journal of food science & technology*, 39(1), 21-29.

Tiilikkala, K., Fagernäs, L., & Tiilikkala, J. (2010). History and use of wood pyrolysis liquids as biocide and plant protection product.

Toledo, R. T. (2007). Wood smoke components and functional properties. *Smoked seafood safety*, 55.

Underwood, G. & Graham, R. G. (1989). Method of using fast pyrolysis liquids as liquid smoke. U.S. Patent No 4,876,108.

Uscanga, B. R. A., Pacheco, J. R. S., & Francios, J. (2005). Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura " *Saccharomyces Cerevisiae*". *e-Gnosis*, 3.

Valle, E. M. A., Gaviño, J. P. A., Gschaedler, A. C., & Cervantes, E. D. C. L. (2016). Extracción y cuantificación de los polisacáridos de la pared celular de las levaduras. *e-Gnosis*, 14.

Versino, F., & García, M. A. (2014). Cassava (*Manihot esculenta*) starch films reinforced with natural fibrous filler. *Industrial Crops and Products*, 58, 305-314.

Villada, H. S., Acosta, H., & Velasco, R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas agrarios*, 12(2), 5-19.

Vitt, S. M., Himelbloom, B. H., & Crapo, C. A. (2001). Inhibition of *Listeria innocua* and *L. monocytogenes* in a laboratory medium and cold-smoked salmon containing liquid smoke. *Journal of Food Safety*, 21(2), 111-125.

Wang, S., Ru, B., Dai, G., Lin, H., & Zhang, L. (2016) a. Influence mechanism of torrefaction on softwood pyrolysis based on structural analysis and kinetic modeling. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(37), 16428-16435.

Wang, W., Li, C., Zhang, H., & Ni, Y. (2016) b. Using liquid smoke to improve mechanical and water resistance properties of gelatin films. *Journal of food science*, 81(5), E1151-E1157.

White, B. D., & Woodward, W. W. (2007). "A most exquisite fellow"—William White and an Atlantic world perspective on the seventeenth-century chymical furnace. *Ambix*, 54(3), 285-298

Widayat, W., Yaqin, N., & Al Baarri, A. N. (2018). Study of utilization liquid smoke and carrageenan as a natural antibacterial in manufacturing beef meatballs. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 102, No. 1, p. 012060). IOP Publishing.

Worrasinchai, S., Supphantharika, M., Pinjai, S., & Jamnong, P. (2006).  $\beta$ -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food hydrocolloids*, 20(1), 68-78.

Xin, X., Dell, K., Udugama, I. A., Young, B. R., & Baroutian, S. (2020). Transforming biomass pyrolysis technologies to produce liquid smoke food flavouring. *Journal of Cleaner Production*, 125368.

Xiu, A., Zhou, M., Zhu, B., Wang, S., & Zhang, J. (2011). Rheological properties of Salecan as a new source of thickening agent. *Food Hydrocolloids*, 25(7), 1719-1725.

Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.

Zhang, Y., & Han, J. H. (2006). Mechanical and thermal characteristics of pea starch films plasticized with monosaccharides and polyols. *Journal of Food Science*, 71(2), E109-E118.

Zhang, Y., & Han, J. H. (2010). Crystallization of high-amylose starch by the addition of plasticizers at low and intermediate concentrations. *Journal of food science*, 75(1), N8-N16.

Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11), 5165-5170.